

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP05/005311

International filing date: 16 March 2005 (16.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-314364  
Filing date: 28 October 2004 (28.10.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

16. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 2004年10月28日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-314364  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

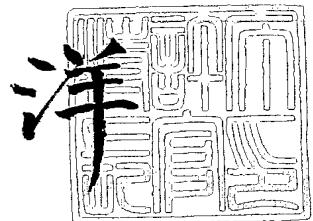
J P 2 0 0 4 - 3 1 4 3 6 4

出願人 株式会社ロコモジエン  
Applicant(s):

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

2005年4月21日

小川



出証番号 出証特2005-3036701

**【書類名】** 特許願  
**【整理番号】** P03-0193A  
**【提出日】** 平成16年10月28日  
**【あて先】** 特許庁長官 殿  
**【国際特許分類】** A61K 48/00  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 神奈川県横浜市都筑区中川 1-2-5 港北ガーデンヒルズA棟  
**【氏名】** 中島 利博  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 神奈川県横浜市青葉区新石川2丁目16番地の7 石川坂マンション305号  
**【氏名】** 山崎 聰士  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 神奈川県横浜市港南区日野中央2-39-9 コスモ港南台507号  
**【氏名】** 八木下 尚子  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 神奈川県川崎市麻生区東百合丘2-20-6 ファイン東百合ヶ丘5 203号室  
**【氏名】** 佐々木 研  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 神奈川県大和市桜森2-4-14 レックス相模大塚駅前205号  
**【氏名】** 加藤 幸裕  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 東京都豊島区駒込6-9-20 サンコーポ山名102号  
**【氏名】** 張 薈  
**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 503302207  
**【氏名又は名称】** 株式会社ロコモジエン  
**【代理人】**  
**【識別番号】** 100092783  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 小林 浩  
**【電話番号】** 03-3273-2611  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100095360  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 片山 英二  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100093676  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 小林 純子  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100120134  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 大森 規雄

**【先の出願に基づく優先権主張】**

【出願番号】 特願2004- 76931  
【出願日】 平成16年 3月17日  
【整理番号】 P03-0193

**【手数料の表示】**

【予納台帳番号】 157061  
【納付金額】 16,000円

**【提出物件の目録】**

【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0314062

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。

**【請求項 2】**

滑膜細胞の増殖を抑制する物質が、シノビオリンの発現阻害物質である請求項 1 記載の医薬組成物。

**【請求項 3】**

シノビオリンの発現阻害物質が、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である請求項 2 記載の医薬組成物。

**【請求項 4】**

hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質が、hsHRD3をコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である請求項 3 記載の医薬組成物。

**【請求項 5】**

hsHRD3をコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含むものである請求項 3 又は 4 記載の医薬組成物。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリッジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ hsHRD3 活性を有するタンパク質をコードするDNA

**【請求項 6】**

siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 4 記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

リウマチ、線維症、関節炎、癌及び/又は脳神経疾患を診断又は治療するための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。  
。

**【請求項 9】**

滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍のアポトーシスを誘起させる方法。

**【請求項 10】**

滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。

**【請求項 11】**

滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞及び破骨細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞からインターロイキン-6 の産生を抑制する方法。

**【請求項 12】**

hsHRD3 の発現の抑制が、hsHRD3 とシノビオリンとの結合阻害によるものである、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 13】**

インターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む医薬組成物。

**【請求項 14】**

インターロイキン-6 の産生を抑制する物質がシノビオリンの発現阻害物質である請求項 13 記載の医薬組成物。

**【請求項 15】**

シノビオリンの発現阻害物質が、hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である請求項 14 記載の医薬組成物。

**【請求項 16】**

hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質が、hsHRD3をコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNAである請求項15記載の医薬組成物。

**【請求項17】**

hsHRD3をコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含むものである請求項15又は16記載の医薬組成物。

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリッジェントな条件下でハイブリダイズし、かつhsHRD3活性を有するタンパク質をコードするDNA

**【請求項18】**

siRNAが、配列番号1に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項16記載の医薬組成物。

**【請求項19】**

関節リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス又は骨粗しょう症を診断又は治療するための請求項13～18のいずれか1項に記載の医薬組成物。

**【請求項20】**

炎症反応を抑制することができる、請求項13～18のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】hsHRD3を含む医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、シノビオリンのヒトオルソログhsHRD3を含む医薬組成物、特に関節リウマチを診断又は治療するための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ（以下、RAという）は、関節の滑膜組織に異常な増殖が見られる全身性の炎症性疾患である。本発明者は、この滑膜組織の異常増殖に必須の遺伝子としてシノビオリン遺伝子を同定している（WO 02/052007；特許文献1）。

【0003】

シノビオリンは、RA患者由来の滑膜細胞に存在する膜タンパク質であり、RING fingerモチーフを有するE3ユビキチンライゲースをコードするものである。このモチーフは、タンパク質のユビキチン化に重要な役割を果たすが、実際、自己ユビキチン化活性を有すること、P4HA1というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を起こすことが証明されている（特許文献1）。また、最近では、シノビオリンが線維症、癌又は脳神経疾患の発症にも関与することが見出されている（非特許文献1）。

【0004】

シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログであるHrd1pは、Hrd3pと機能的複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解にかかわることが見出されている（非特許文献2）。しかしながら、Hrd3pに関する機能は明らかではない。

【0005】

インターロイキン-6はインターロイキン-1、TNF- $\alpha$ とともに炎症性サイトカインとよばれ、種々の炎症反応を引き起こすサイトカインである。通常免疫系の細胞により產生され、リウマチ滑膜細胞、白血病、骨髄腫など様々な増殖性疾患を引き起こす細胞からもあるが、リウマチ滑膜細胞、白血病、骨髄腫など様々な増殖性疾患を引き起こす細胞からも产生され、それらの増殖に必須である。インターロイキン-6が関与する病気として、関節リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などがある。インターロイキン-6は細胞表面に発現するインターロイキン-6レセプターに結合する場合もあれば、細胞表面から遊離したレセプターと結合し、レセプターを発現していない細胞に結合することにより、炎症反応を誘導する場合もある。インターロイキン-6の炎症作用として、B細胞の抗体產生細胞への分導する場合もある。インターロイキン-6の炎症作用として、B細胞の抗体產生細胞への分導、肝臓におけるC-反応性タンパク質產生量の増加、骨髄における血小板の誘導、免疫分化、肝臓におけるVEGFの誘導を介した細胞の炎症部位への誘導、白血球のアポトーシスへの抵抗性の寄与、VEGFの誘導を介した血管の誘導などが挙げられる。最近、インターロイキン-6とレセプターの結合を阻害するインターロイキン-6レセプター抗体が作られるようになり、慢性関節リウマチ、骨髄腫、クローン病などに効果を發揮している。

【特許文献1】国際公開第 02/052007号パンフレット

【非特許文献1】Genes Dev. 2003 Vol. 17:2436-49 [Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy].

【非特許文献2】J.B.C. 2000. Vol.151, p69-82, [Endoplasmic Reticulum Degradation Requires Lumen to Cytosol Signaling : Transmembrane Control of Hrd1p by Hrd3p ]

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、滑膜細胞の異常増殖やインターロイキン-6の產生を抑制する物質を含む医薬組成物、及びhsHRD3を抑制することを特徴とする滑膜細胞の増殖を抑制する方法を提供

することを目的とする。

**【課題を解決するための手段】**

**【0007】**

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。出芽酵母のhrd3破壊株において、Hrd1pタンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが報告されていることから、ヒトHrd3pオルソログ（以下、「hsHRD3」という）も、シノビオリンと同様に滑膜組織の異常増殖やインターロイキン-6の産生に必須であることがわかった。そして、hsHRD3を用いて、新たな炎症反応の抑制、リウマチ、線維症、関節症、癌及び脳神経疾患等の診断法及び治療法の開発に有効であると考え、本発明を完成するに至った。

**【0008】**

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。

**【0009】**

滑膜細胞の増殖を抑制する物質としては、例えばシノビオリンの発現阻害物質が挙げられる。シノビオリンの発現阻害物質は、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質、好ましくは、hsHRD3をコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNAを例示することができる。

**【0010】**

具体的にはhsHRD3をコードする遺伝子は、以下の(a)又は(b)のDNAを含むものである。

すなわち、

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつhsHRD3活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

**【0011】**

さらに、siRNAは、配列番号1に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものであつてもよい。

**【0012】**

本発明の医薬組成物は、リウマチ、線維症、関節炎、癌及び/又は脳神経疾患を診断又は治療するために使用される。

(2) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。

(3) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍におけるアポトーシスを誘起させる方法。

(4) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。

(5) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞、破骨細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞からインターロイキン-6の産生を抑制する方法。

(6) インターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物。

**【0013】**

インターロイキン-6の産生を抑制する物質としては、例えばシノビオリンの発現阻害物質が挙げられる。シノビオリンの発現阻害物質は、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質、好ましくは、hsHRD3をコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNAを例示することができる。

**【0014】**

具体的にはhsHRD3をコードする遺伝子は、以下の(a)又は(b)のDNAを含むものである。

すなわち、

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリッジメントな条件下でハイブリダイズし、かつhsHRD3活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

#### 【0015】

さらに、siRNAは、hsHRD3をコードする遺伝子の塩基配列のうち一部の配列を標的とするものであってもよい。

#### 【0016】

本発明の医薬組成物は、関節リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症を診断又は治療するために使用される。また、本発明の医薬組成物は炎症反応を抑制することもできる。

#### 【0017】

上記(2)～(5)記載の方法において、滑膜細胞のhsHRD3の発現抑制は、例えばhsHRD3とシノビオリンとの結合阻害により行うことができる。

#### 【発明の効果】

#### 【0018】

本発明により滑膜細胞（滑膜組織を含む）の異常増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物が提供される。この物質は、滑膜組織又は滑膜細胞の異常増殖を抑制することができるため、リウマチ、線維症、関節症、癌及び/又は脳神経疾患の診断用又は治療用医薬組成物として有用である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0020】

本発明は、hsHRD3の発現を抑制し、滑膜細胞の異常増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む、リウマチ等の疾患の診断、治療に有効な医薬組成物に関する。

#### 【0021】

シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログであるHrd1pは、Hrd3pと機能的な複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解に関わることが見出されている。出芽酵母のhrd3破壊株ではHrd1pの不安定化と減少が観察され、生理学的な基質の安定化と増加が報告されている。このことは、ヒトHrd3pオルソログ(hsHRD3)もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、新たな関節症の診断、および治療法の開発に有効であることを示している。

#### 【0022】

そこで、本発明において、まず出芽酵母Hrd3pのアミノ酸配列を用いてホモロジー検索をした結果、SEL1Lという既知の遺伝子が見出された。Hrd3pとSEL1Lとの間においてアミノ酸配列の相同性は30%、類似性は45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従って、SEL1LはHrd3pのオルソログであると決定した（図1）。次に2本鎖RNA(siRNA)を用いて滑膜細胞を処理すると、hsHRD3の発現を抑制できることを確認した（図2）。この条件下においては、滑膜細胞の細胞増殖活性は顕著に減少していた（図3）。また約30%の細胞がアポトーシスを起こしていた（図4、5）。

#### 【0023】

出芽酵母においてHrd3pはHrd1pの安定化に必須である。そこでシノビオリンタンパク質をWestern Blottingで検出したところ、シノビオリンタンパク質は、hsHRD3抑制下において著しく減少していた（図6）。また、シノビオリンの発現が抑制されると、コラーゲン産生量も減少する。そこで、細胞内のコラーゲン量を測定したところ、これもコントロールに比べて減少していた（図7）。さらに、hsHRD3はシノビオリンと細胞内で複合体を形成し（図8）、共に小胞体に局在している（図9）ことが明らかとなった。なお、滑膜細胞の増殖に重要な役割を果たしているインターロイキン-6も半分近くまで減少してい

た（図10）。また、細胞内にシノビオリンタンパク質が存在しないときは、hsHRD3は著しく減少し（図11）、非常に不安定であった（図12A及び図12B）。

#### 【0024】

以上の結果は、hsHRD3をターゲットとするアプローチは、RAをはじめとする関節炎、線維症、癌及び脳神経疾患の新たな診断及び治療法の開発に有効であることを示している。特にSEL1L/hsHRD3の発現や機能のコントロールを通して、シノビオリンの発現や機能を制御するという作用機序に基づいた薬剤の開発に有用である。

##### 1. 滑膜細胞の増殖抑制

本発明において、「滑膜細胞」とは、リウマチ患者の関節部位において異常増殖している一連の細胞群を意味し、滑膜組織も包含する。

#### 【0025】

本発明において、「hsHRD3」とは、酵母のシノビオリンであるHrd1pと結合して機能的複合体を形成し、小胞体の異常なタンパク質の分解に携わっている「Hrd3p」と呼ばれるタンパク質のヒトオルソログをいう。シノビオリンは、酵母からヒトまで高度に保存されており、特に出芽酵母において詳細な解析が行われている。この出芽酵母のオルソログであるHrd3pとアミノ酸のホモロジーが相同性で30%、類似性で45%であり、特異的な繰返し構造と膜貫通ドメインが保存されているSEL1Lという遺伝子が見いだされ、これが後にhsHRD3とされた。このhsHRD3は、配列番号1に示される塩基配列およびそのような配列と実質的に同一な塩基配列とは、配列番号1からなるDNAに対し相補的な塩基配列よりなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつhsHRD3活性を有するタンパク質をコードする塩基配列をいう。「hsHRD3活性」とは、小胞体において、異常なタンパク質を分解する活性をいう。このような、hsHRD3をコードするDNAは、当業者に公知の方法で適当な断片を用いてプローブを作製し、このプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーション、サザンプロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、cDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーから得ることができる。上記ハイブリダイゼーションにおいてストリンジェントな条件としては、たとえば、ハイブリダイゼーションにおいて洗浄時の塩濃度が100～500 mM、好ましくは150～300 mMであり、温度が50～70°C、好ましくは55～65°Cの条件が挙げられる。

#### 【0026】

hsHRD3のアミノ酸配列を配列番号2に、Hrd3pのアミノ酸配列を配列番号3に示す。

#### 【0027】

このhsHRD3の発現を抑制すると、滑膜細胞の増殖活性が著しく抑制される。滑膜細胞とは、通常の関節構成要素となる細胞であって、関節腔の内側の層を満たす滑液を産生する細胞である。

#### 【0028】

シノビオリン遺伝子の発現を抑制するには、hsHRD3の発現を抑制する方法が採用される。hsHRD3の発現を抑制するには、RNAiという現象を利用することができるが、遺伝子工学技術を用いた部位特異的突然変異誘発法、アンチセンスヌクレオチド、リボザイムを用いてよい。

#### 【0029】

RNAiとは、dsRNA(double-strand RNA)が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害する現象である。例えば、dsRNAを細胞内に導入すると、そのRNAと相同配列の遺伝子の発現が抑制（ノックダウン）される。

#### 【0030】

上記RNAiを起こさせるために、例えばシノビオリン遺伝子に対するsiRNA（small interfering RNA）又はshRNA(short hairpin RNA)を設計及び合成し、これを作用させればよい。あるいは、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制しても、シノビオリンの発現を抑制することができる。

**【0031】**

siRNAの設計基準は、以下の通りである。

**【0032】**

(a) シノビオリンをコードする遺伝子の開始コドンから100ヌクレオチド下流の領域を選択する。

**【0033】**

(b) 選択した領域から、AAで始まる連続する15~30塩基、好ましくは19塩基の配列を探し、その配列のGC含量が30~70%、好ましくは45~55%となるものを選択する。

**【0034】**

具体的には、以下の塩基配列を有するものをsiRNAとして使用することができる。

**【0035】**

センス鎖 : CUUGAUUAUGGACCAGCUUUTT (配列番号4)

アンチセンス鎖 : AAAGCUGGUCCAUAUCAAGTT (配列番号5)

siRNAを滑膜細胞に導入するには、in vitroで合成したsiRNAをプラスミドDNAに連結してこれを細胞に導入する方法、2本鎖RNAをアニールする方法などを採用することができる。

**【0036】**

このようにsiRNAで滑膜細胞を処理して、hsHRD3の発現を抑制する。

**【0037】**

また、本発明は、RNAi効果をもたらすためにshRNAを使用することもできる。shRNAとは、ショートヘアピンRNA(short hairpin RNA)と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有するRNA分子である。

**【0038】**

shRNAは、その一部がステムループ構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列Aとし、配列Aに対する相補鎖を配列Bとすると、配列A、スペーサー、配列Bの順でこれらの配列が一本のRNA鎖に存在するように連結し、全体で45~60塩基の長さとなるように設計する。配列Aは、標的となるhsHRD3遺伝子(配列番号1)の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されるものではなく、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列Aの長さは19~25塩基、好ましくは19~21塩基である。

**【0039】**

滑膜細胞の増殖を測定する方法は、培養液中にalamarBlueを適量添加し、数時間後の540nmを励起波長としたときの590nmの蛍光強度を測定すればよい。

**【0040】**

さらに、シノビオリン遺伝子又はhsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制するために、部位特異的突然変異誘発法等を使用することができる。部位特異的突然変異誘発法は当分野において周知であり、市販のキット、例えばGeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km等 (タカラバイオ社製) ) を使用することができる。

**【0041】**

本発明は、hsHRD3とシノビオリンが結合して形成された、小胞体に局在する複合体の形成を阻害することにより、シノビオリンの発現を抑制する方法を提供する。

**【0042】**

hsHRD3とシノビオリンとが結合して複合体を形成すると、シノビオリンの発現が上昇する。この場合、hsHRD3とシノビオリンの複合体は小胞体に局在する。小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス(例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等)に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス(ERストレス)といい、小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質(unfolded protein)の出現頻度を上昇させる。適切な高次構造がとれずに立体構造に異常をきたした不良又は損傷タンパク質は小胞体を出てゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質等が蓄積されてしまう。そこで、これらのERストレ

スに対して、細胞はUPR(Unfolded Protein Response)及びERAD(Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation)と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質等を分解し、そのような不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐことにより、小胞体の品質管理を行い、細胞機能の恒常性を保持している。出芽酵母の

---

hrd3破壊株においては、Hrd1pタンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが観察されているため、ヒトにおいても、シノビオリンと複合体を形成しているhsHRD3がこの品質管理機能に何らかの関与をしていると考えられる。

#### 【0043】

つまり、hsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンと結合するhsHRD3が減少し、その結果シノビオリンの発現も抑制されるのである。

#### 【0044】

また、シノビオリンの発現が増加すると、ERADが亢進されることにより、ERストレスによるアポトーシスの感受性が低下し、反対に、シノビオリンの発現が抑制されると、アポトーシスの感受性が増加する。したがって、hsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンの機能も低下し、結果としてアポトーシスが亢進する。

#### 【0045】

一方、コラーゲンについては、シノビオリンはP4HA1というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を通じて、その酵素としての品質を保つことにより、コラーゲン合成に必須の働きをしている。シノビオリンの発現が抑制されるとP4HA1の酵素活性が低下し、コラーゲン合成が低下する。したがってhsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンの機能も低下し、結果としてコラーゲン合成が低下する。

#### 【0046】

したがって、hsHRD3もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、hsHRD3を用いることにより、新たなリウマチ、線維症、関節症、癌および脳神経疾患の診断、および治療法を開発することができる。

#### 【0047】

上記の滑膜細胞の増殖を抑制するシノビオリンの発現阻害物質は、インターロイキン-6の産生を抑制する物質でもある。

#### 【0048】

インターロイキン-6はBリンパ球の増殖分化のみならず、広く免疫応答、造血反応、炎症反応、及び神経系の細胞の増殖・分化、あるいは機能発現に重要な役割をしている多機能を有する典型的なサイトカインである。慢性炎症性増殖性疾患においては、インターロイキン-6が病態を形成するのに重要な役割を演じていることが知られており、インターロイキン-6遺伝子の異常発現により慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患や、形質細胞腫の発症が誘導されることが明らかになっている。例えば、慢性関節リウマチ患者関節液中には、インターロイキン-6が著増していること、形質細胞腫/多発性骨髄腫の増殖因子がインターロイキン-6そのものであること、インターロイキン-6が、骨髄性白血病細胞に作用し、増殖を抑制するとともに、マクロファージへの分化を誘導することなどである。

#### 【0049】

従って、インターロイキン-6の産生を抑制するには、上記の滑膜細胞の増殖を抑制するシノビオリンの発現阻害物質を用いることができる。具体的には、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である、hsHRD3をコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNAなどを用いることができる。

#### 【0050】

## 2. 医薬組成物

### (1) 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、リウマチ、線維症、関節炎、癌などの細胞増殖性疾患及び/又は脳神経疾患が挙げられる。

**【0051】**

本発明の医薬組成物を癌の治療剤として使用する場合は、適用部位は特に限定されず、脳腫瘍、舌癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、肺腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指腸癌、大腸癌、肝癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、皮膚癌、各種白血病（例えば急性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型T細胞白血病、悪性リンパ腫）等を対象として適用される。

**【0052】**

上記癌は、原発巣であっても、転移したものであっても、他の疾患と併発したものであってもよい。

**【0053】**

脳神経系疾患としては、例えばアルツハイマー、パーキンソン病、ポリグルタミン病が挙げられる。

## (2) インターロイキン-6の產生を抑制する物質を含む医薬組成物

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、関節リウマチ、多発骨髓腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などが挙げられる。

**【0054】**

また、インターロイキン6は炎症に伴う多くの症状（痛み、発熱など）を引き起こすサイトカインでもある。したがって、本発明の医薬組成物は、炎症反応を抑制することもできる。炎症反応とは、生体に感染や外傷、火傷あるいはアレルゲンなどの刺激により起きる。炎症反応は、局所的な組織反応をいい、局所反応に伴う全身的な現象も含まれる。具体的には、発赤、発熱、疼痛、腫脹に機能障害を加えて、炎症の五徴という。これらは急性炎症の肉眼的、発熱、疼痛、腫脹に機能障害を加えて、炎症の五徴という。これらは急性炎症の肉眼的特徴を示しているが、この現象は局所的な血管の変化、すなわち、血管の拡張、透過性の亢進、白血球の浸潤によるものである。

本発明の滑膜組織の異常増殖やインターロイキン-6の產生を抑制する物質を有効成分として含有する医薬組成物の投与形態は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。経口投与の場合は、液剤として、または適当な剤型により投与が可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。

**【0055】**

本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

**【0056】**

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。本発明の医薬組成物を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等から全身投与する。脳等に局所投与することもできる。本発明の医薬組成物を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

**【0057】**

本発明の医薬組成物は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容される担体や添加物を含むものであってもよい。このような担体及び添加物として、水、医薬的

に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレン glycol、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

#### 【0058】

上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された滑膜組織の異常増殖を抑制する物質を溶剤(例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等)に溶解し、これにTween n80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

#### 【0059】

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によつて異なる。投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり $0.1\text{ }\mu\text{g} \sim 100\text{ mg}$ 、好ましくは $1 \sim 10\text{ }\mu\text{g}$ である。但し、上記治療剤はこれら～ $10^6$ の投与量に制限されるものではない。アデノウイルスの場合の投与量は1日1回あたり $10^{13}$ 個程度であり、1週～8週間隔で投与される。但し、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。siRNAを混合する場合の用量は、 $0.01 \sim 10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $0.1 \sim 1\text{ }\mu\text{g/ml}$ である。

#### 【0060】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例1】

##### 【0061】

出芽酵母Hrd3pを用いたホモロジー検索

出芽酵母Hrd3p/Ylr207wpのアミノ酸配列を用いてホモジーサーチを実行した。

##### 【0062】

その結果、酵母Hrd3pのヒトオルソログである配列番号1に示す塩基配列によりコードされるアミノ酸配列に相当するタンパク質を同定し、SEL1L遺伝子が見出された。Hrd3pのアミノ酸配列を配列番号3に示す。Hrd3pとSEL1Lとの間においてアミノ酸配列の相同性は30%、類似性は45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従って、SEL1LはHrd3pのオルソログであると決定した(図1)。

#### 【実施例2】

##### 【0063】

SEL1L/hsHRD3の発現抑制の検討

(1) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA(siRNA)でトランスフェクションし、96時間後に細胞を回収した。RNAを抽出しRT-PCRで各遺伝子の発現量を定量した。

##### 【0064】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6 cm Dish 1枚に付き、 $1 \times 10^4$  個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し(ネガティブコントロール)の各サンプルに付きDish一枚、合計4枚播いた。培地は10% FBS(牛胎児血清)を含み、抗生素質を含まないDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を3ml用いた。24時間後、血清も抗生素質も含まないDMEM 3mlで一回洗い、同

じDMEMを1.6ml加えた。

#### 【0065】

その後トランスフェクション試薬を添加した。トランスフェクション試薬は次のように調整した。GFP、hsHRD3、シノビオリンを標的としたRNAiのために、下記配列に示したRNAオリゴ（配列番号4～9）を最終濃度が100μMになるようにTEに溶かした。

#### 【0066】

hsHRD3を標的としたsiRNAのセンス鎖：CUUGAUUAUGGACCAGCUUUTT（配列番号4）

hsHRD3を標的としたsiRNAのアンチセンス鎖：AAAGCUGGUCCAUCAAGTT（配列番号5）

GFPを標的としたsiRNAのセンス鎖：GGCUACGUCCAGGAGGCCATT（配列番号6）

GFPを標的としたsiRNAのアンチセンス鎖：UGCCUCUCCUGGACGUAGCCTT（配列番号7）

シノビオリンを標的としたsiRNAのセンス鎖：GGUGUUUCUUUGGGCAACUGAGTT（配列番号8）

シノビオリンを標的としたsiRNAのアンチセンス鎖：CUCAGUUGCCTCAAAGAACACCTT（配列番号9）

各遺伝子に対するRNAオリゴのセンス鎖とアンチセンス鎖を20μMになるように混合した。90℃で2分間熱変性した後、37℃で1時間ゆっくり冷却することにより、両オリゴをアニーリングさせた。アニーリングした20μM RNAオリゴ10μlをOptimem 350μlと混合しA液を作った。次にOligofectamine<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen, Cat. No. 12252-011) 8μlをOptimem 32μlと混合しB液を作った。A液とB液を5分間インキュベート後、両者を混合し、さらに15分インキュベートした。この混合液400μlを全量、培地を交換した各Dishに加えた。その4時間後、FBSを200μl添加した。

#### 【0067】

トランスフェクション試薬添加96時間後、細胞からフェノール抽出法で全RNAを抽出し、RT-PCRに用いた。RT-PCRはSUPERSCRIPT<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR 100 Reactions (Invitrogen Cat. No. 10928-042) を用いた。すなわち、2 x RXN mix 50μl、RT/Platinum 2μl、DEPC水 28μl、以下に示す增幅用プライマー3.2μM溶液の各セット10μl x 2、合計100μlを混合し、10μlずつPCRチューブに分注した。そして1μlのRNAをRT-PCRテンプレートとして添加してPCR反応を開始した。

#### 【0068】

hsHRD3增幅用オリゴマー（5'→3'）：GGCTGAACAGGGCTATG（配列番号10）

hsHRD3增幅用オリゴマー（3'→5'）：CCGCTCGAGTTACTGTGGTGGCTGCTGCTC（配列番号11）

シノビオリン増幅用オリゴマー（5'→3'）：AGCTGGTGTGTTGGCTTGAG（配列番号12）

シノビオリン増幅用オリゴマー（3'→5'）：GGGTGGCCCTGATCCGCAG（配列番号13）

hGAPDH増幅用オリゴマー（5'→3'）：AGGTGAAGGTCGGAGTCAACCGA（配列番号14）

hGAPDH増幅用オリゴマー（3'→5'）：AGTCCTTCCACGATACCAAAGTTG（配列番号15）

RNAオリゴ無しは100、50、10ng、その他は100ngのRNAをテンプレートとして用いた。サイクルは、cDNA伸長反応として50℃30分94℃2分を一回、続けてPCR増幅反応として94℃30秒、50℃30秒、72℃1分を30回行い、最後に72℃5分最終伸長反応を行った後4℃で保存した。このPCR反応液に2μlの6xSample Bufferを加え、全量を0.8%アガロースで100ボルト30分泳動しUVイマルミネーターでPCR産物を検出した。

#### 【0069】

その結果、siRNAにより、SEIL/hsHRD3の発現が抑制された（図2）。図2において、hsHRD3のRNAiによりPCR産物の量が、10ngのオリゴ無し（ネガティブコントロール）と同じレベルに減少したことから、hsHRD3のmRNAの発現レベルが10%以下に抑制されたことが分かった。またこのときシノビオリンのmRNAは100ngのオリゴ無しやGFP RNAiと同レベルであったことからhsHRD3の発現抑制はシノビオリンの転写には影響を与えないことが分かった。

(2) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA（siRNA）でトランスフェクションし、48時間後にalamarBlue<sup>TM</sup>を添加した。さらに48時間後に細胞増殖活性を測定した。

## 【0070】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を96-well plateの各wellに付き、160個の細胞を播いた。培地は10% FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を100 $\mu$ l用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 100 $\mu$ lで一回洗い、同じDMEMを80 $\mu$ l加えた。その後実施例2(1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬を20 $\mu$ lずつ、培地を交換した各wellに加えた。さらに4時間後、FBSを10 $\mu$ l添加した。トランスフェクション試薬添加48時間後に各wellに10 $\mu$ lのalamarBlue<sup>TM</sup>を添加した。48時間37℃でインキュベートした後、560nmで励起したときの590nmの蛍光強度を測定した。

## 【0071】

その結果、SEL1L/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が約60%にまで抑制された（図3）。

## 【0072】

このことは、hsHRD3はシノビオリン同様にRA滑膜細胞の細胞増殖に重要であり、その発現抑制は細胞の増殖低下を引き起こすことを意味する。

(3) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし120時間後に細胞を回収した。回収した細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、FACSでDNA含量を測定した。

## 【0073】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6 cm Dish 1枚に付き、1 x 10<sup>4</sup> 個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し（ネガティブコントロール）の各サンプルに付きDish一枚、合計4枚播いた。培地は10% FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を3ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 3mlで一回洗い、同じDMEMを1.6ml加えた。その後実施例2(1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬400 $\mu$ lを全量、培地を交換した各Dishに加えた。さらに4時間後、FBSを200 $\mu$ l添加した。

## 【0074】

トランスフェクション試薬添加120時間後、全細胞を回収し、0.5mlのPBS(-) / 0.2% TritonX-100で可溶化した後、ナイロンメッシュを通して、細胞塊を取り除いた。1mlの50 $\mu$ g/ml RNase/PBS(-)と1mlの100 $\mu$ g/mlのヨウ化プロピジウム/PBS(-)を加え、混合した後、氷中に保存した。各細胞の蛍光量をFACSCalibur (BECKON DICKINSON)で計測し、CELLQuestで解析した。

## 【0075】

その結果、図4に示すようにアポトーシスを起こしたと考えられるDNA含量2n以下の細胞群がhsHRD3のRNAiにより30%以上にまで増加した。またこの割合はシノビオリンに対するRNAiと同程度に高かった（図5）。このことは、hsHRD3はシノビオリン同様に滑膜細胞の増殖に必須の遺伝子であり、その発現抑制は高頻度のアポトーシスを引き起こすことを意味している。

## 【実施例3】

## 【0076】

(1) SEL1L/hsHRD3の発現抑制下におけるWestern Blottingを用いたシノビオリンの検出  
RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。総抽出液を抽出しWestern Blottingで各タンパク質を検出した。

## 【0077】

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を10 cm Dish 1枚に付き、9 x 10<sup>4</sup> 個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し（ネガティブコントロール）の各サンプルに付きDish一枚、合計4枚播いた。培地は10% FBS（牛

胎児血清) を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046) を10ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 10mlで一回洗い、同じDMEMを9ml加えた。その後実施例2 (1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬の3倍量1.2mlを、培地を交換した各Dishに加えた。さらに4時間後、FBSを1ml添加した。

#### 【0078】

トランスフェクション試薬添加48時間後、全細胞を回収し、 $50\mu\text{l}$ のExtraction Buffer IV (50mM Tris-HCl pH7.5、2mM EDTA、0.1% Triton X-100、1% NP-40、500mM NaCl、1mM PMSF、0.1% Aprotinin、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$  PepstatinA、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin) にResuspendした後、氷中に30分置き、14000rpm、4°C、30分遠心した。上清 $1\mu\text{l}$ をBio-Rad DC Protein Assay Reagent (BIO-RAD、Cat. No. 500-0116) を用いたタンパク質濃度測定に用い、残り $45\mu\text{l}$ に $15\mu\text{l}$ の4 x SDS Bufferを加え、100°Cで5分加熱した。 $10\mu\text{g}$ 相当の細胞抽出液を $7.5\%$ アクリルアミドゲル2枚で泳動、分離し、ニトロセルロース膜 (OPTITRAN BA-S 85 REI NFORCED NC、Schleicher & Schuell、Cat. No. 10 439196) にプロット後、5%スキムミルクで30分ブロッキングした。

#### 【0079】

一次抗体として1000倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体 (10Da) または抗CREB-1抗体 (Santa Cruze、Cat. No. sc-58) で30分インキュベートした。抗シノビオリンモノクローナル抗体の二次抗体には2000倍希釈したHRP-conjugated anti-mouse IgG (Amersham Biosciences、Cat. No. NA931V) を、抗CREB-1抗体には3000倍希釈したHRP-conjugated anti-Rabbit IgG (Amersham Biosciences、Cat. No. NA931V) を使用し、30分インキュベートした。検出はHome-made ECL ( $44\mu\text{l}$ の90mM クマリン酸、 $100\mu\text{l}$ の250mM ルミノール、 $6\mu\text{l}$ の過酸化水素水を20mlの100mM Tris pH8.5で混合したもの)を使用した。

#### 【0080】

その結果、シノビオリンタンパク質は、SEL1L/hsHRD3 抑制下において著しく減少していた(図6)。すなわち、hsHRD3の発現抑制はシノビオリンタンパク質の不安定化を引き起こすことが明らかになった。

#### (2) シノビオリンの発現抑制下におけるコラーゲン産生量の検討

RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。総抽出液を調製し、細胞内のコラーゲン量を測定した。

#### 【0081】

すなわち、実施例3 (1)と同様な方法でトランスフェクション、細胞抽出液を調製し、 $30\mu\text{g}$ 相当の抽出液をExtraction Buffer IVで $100\mu\text{l}$ に調節した後、SIRCOL Collagen Assay Kit (QBS社 / フナコシ Cat. No. S1111)でコラーゲン量を測定した。

#### 【0082】

その結果、hsHRD3をノックアウトした細胞はコントロール (GFP) に比べて、細胞内コラーゲン量が約70%にまで減少していた(図7)。

#### 【0083】

すなわち、hsHRD3はシノビオリンタンパク質の安定化を通じて、コラーゲンの産生を促進しており、hsHRD3の発現を抑制することにより、シノビオリンタンパク質の量が減少し、コラーゲン産生量を低下させることができる。

### 【実施例4】

#### 【0084】

SEL1L/hsHRD3とシノビオリンの細胞内における複合体の形成

HEK293細胞にSP-HA-hsHRD3BとFLAG-シノビオリンのプラスミドをトランスフェクションした。48時間後に細胞を回収し、総抽出液を調整した。抗FLAG抗体(a)、または抗HA抗体(b)で免疫沈降し、それぞれの抗体でWestern Blottingを行った。

#### 【0085】

すなわち、hsHRD3Bのシグナルペプチド (SP) の直後、配列番号1に示されたアミノ酸配

列の26番目と27番目との間にHA tagが挿入されるようにDNA構築したプラスミド（SP-HA-hsHRD3B）をpcDNA3-vectorにCloningした。

#### 【0086】

$8 \times 10^5$  個のHEK293細胞を10cm Dish 4枚に播いた。24時間後、以下の(c)～(f)の4種類の組み合わせのプラスミドをトランスフェクションした。

#### 【0087】

- (c)  $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のpCAGGS-vector
- (d)  $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン / pCAGGS
- (e)  $10 \mu\text{g}$ のpcDNA3-vectorと $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン / pCAGGS
- (f)  $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン/pCAGGS

トランスフェクション48時間後、細胞を回収し、 $200 \mu\text{l}$ のExtraction Buffer II ( $10 \text{ mM Tris-HCl pH}7.5$ 、 $150 \text{ mM NaCl}$ 、 $0.5\%$  NP-40、 $10 \text{ mM MgCl}_2$   $10\%$  glycerol、 $5 \text{ mM EGTA}$ 、 $2 \text{ mM NaF}$ 、 $50 \text{ mM } \beta\text{-glycerophosphate}$ 、 $1 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$ 、 $10\text{mM}\text{NEM}$  (N-Ethylmaleimide)、 $1 \text{ mM PMSF}$ 、 $1 \text{ mM DTT}$ 、 $0.1\%$  Aprotinin、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  PepstatinA、 $1 \mu\text{g/ml}$  Leupeptin) にR esuspendし、氷上で30分インキュベートした後、 $14000\text{rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、30分遠心した。タンパク質 $100 \mu\text{g}$ 相当の抽出物をExtraction Buffer IIで $1\text{ml}$ に調節した。このとき同時に牛血清アルブミンを最終濃度 $0.5\%$ になるように加えた。

#### 【0088】

次に、トランスフェクション (c) (d) 由来の抽出物には $4.9\text{mg}$ の抗FLAG抗体(M2、SIGMA Cat. No. F3165)を、(e) (f) 由来の抽出物には $2.4\text{mg}$ の抗HA抗体(12CA5、Roche、Cat. No. 1 583 816)を加え、 $4^\circ\text{C}$ で一晩浸透しながらインキュベートした。翌日、 $50\% \text{ slurry}$ のProtein-G Sepharose Beadsを $60 \mu\text{l}$ 加え、さらに $4^\circ\text{C}$ で一時間インキュベートした。このBeadsを $0.5\text{ml}$ のExtraction Buffer IIで二回、 $0.5\text{ml}$ のExtraction Buffer II +  $150 \text{ mM NaCl}$  (最終濃度 $300\text{mM NaCl}$ ) で二回洗い、 $30 \mu\text{l}$ の $2 \times$  SDS Sample Bufferを加え、 $100^\circ\text{C}$ 、5分熱することにより、吸着したタンパク質を溶出した。実施例3 (1) と同様の方法でSDS-PAGE、Western Blottingを行い、免疫沈降したタンパク質を検出した。

#### 【0089】

その結果、SEL1L/hsHRD3 はシノビオリンと細胞内で複合体を形成していることが判明した(図8)。

##### (2) SEL1L/hsHRD3とシノビオリンの細胞内における共局在

HEK293細胞をSP-HA-hsHRD3BとFLAG-シノビオリンのプラスミドでトランスフェクションした。24時間後に細胞を固定し、抗HA抗体と抗シノビオリンモノクローナル抗体で免疫染色した。

#### 【0090】

すなわち、2000個のHEK293細胞をChamberslideの各Chamberに播いた。24時間後、 $0.15 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $0.05 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリンでトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、細胞を $4\%$ パラホルムアルデヒドで30分固定し、 $3\%$  BSA / PBS(-)で一晩ブロッキングした。翌日最終濃度が $1 \text{ ng} / \mu\text{l}$ になるように $0.3\%$  BSA / PBS(-)で希釈した抗HA抗体 (3F10、Roche、Cat.No. 1 867 431) と100倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体 (10Da) で染色し、抗HA抗体は抗ラットIg FITC抗体 (DAKO、Cat.No. R0270、Cat.No.F0234) で、抗シノビオリン抗体は抗マウスIg TRITC抗体 (DAKO、Cat.No. R0270) で検出した。サンプルの観察、撮影は共焦点レーザースキャン顕微鏡LSM510 (Carl Zeiss Co.,Ltd.) で、画像解析はLSM510-v3.0で行った。

#### 【0091】

その結果、SEL1L/hsHRD3とシノビオリンは小胞体に共局在した(図9)。図9において、左列はhsHRD3の局在の図(緑色)、中央列はシノビオリンの局在の図(赤色)、右列は両者を重ね合わせた図(黄色)である。

#### 【0092】

これらの結果より、hsHRD3はシノビオリンと小胞体において複合体を形成していること

が判明した。

### 【実施例5】

#### 【0093】

SEL1L/hsHRD3の発現抑制下におけるインターロイキン-6産生量の検討

(1) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (siRNA) でトランスフェクションし、96時間後に培地を新しいものに交換した。さらに24時間後に培地を回収し、その中に含まれるインターロイキン-6の量を測定した。

#### 【0094】

すなわち、トランスフェクション前日に、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6 cm Dish 1枚に付き、 $1 \times 10^4$  個の細胞を播いた。三種類のRNAiとRNAオリゴ無し（ネガティブコントロール）の各サンプルに付きDish一枚、合計4枚播いた。培地は10% FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046) を3ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 3mlで一回洗い、同じDMEMを1.6ml加えた。その後実施例2 (1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬400 μlを全量、培地を交換した各Dishに加えた。さらに4時間後、FBSを200 μl添加した。

#### 【0095】

トランスフェクション試薬添加96時間後、培地を新しいものに交換した。24時間培養後、培地を回収し、14000rpm、30min、4°Cで遠心した。その上清中に含まれるインターロイキン-6タンパク質量をELISA Kit (BIOSOURCE Immunoassay Kit for Human IL-6, Cat. # KHC0061) で測定した。同時に細胞も回収し、20 μLのExtraction Buffer III (10 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 1% NONIDET P-40, 0.1% SDS, 200 mM NaCl 10 mM N-ethylmaleimide (NEM), 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol, 0.1% aprotinin, 0.5 μg/ml pepstatin A, 1 μg/ml leupeptin) に溶かし氷上に30分置いた。14000rpm、30min、4°Cで遠心した後、上清1 μlをBio-Rad DC ProteinAssay Reagent (Bio-RAD Cat. No. 500-0116) を用いたタンパク質濃度測定に用いて、総タンパク質量を算出した。培地中のインターロイキン-6タンパク質量をこの総タンパク質量で割った値をグラフ化した（図10）。

#### 【0096】

その結果、SEL1L/hsHRD3の発現抑制により、インターロイキン-6タンパク質の産生量がコントロールに比べ、63.2%にまで減少した（図10）。すなわちSEL1L/hsHRD3はインターロイキン-6の産生に必須な因子であることが明らかになった。

(2) 上記(1)で調整した細胞総抽出液45 μlに15 μlの4 x SDS Bufferを加え、37°Cで10分加熱した。10 μg相当の細胞抽出液を7.5%アクリラミドゲルで泳動、分離し、ニトロセルロース膜 (OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC, Schleicher & Schuell, Cat. No. 10439196) を用いてプロットした後、5%スキムミルクで30分ブロッキングした。

#### 【0097】

一次抗体として1000倍希釈した抗SEL1L/hsHRD3ペプチド抗体で30分インキュベートした。二次抗体には10000倍希釈したHRP-conjugated anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences, Cat. No. NA934V) を用いて30分インキュベートした。検出はECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, Cat. No. RPN2132) を使用した。

#### 【0098】

検出後、再度ブロッキングし、一次抗体として1000倍希釈した抗シノビオリン抗体と500倍希釈した抗α-tubulin抗体 (SIGMA Clone B-5-1-2) を用いて30分インキュベートした。二次抗体には10000倍希釈したHRP-conjugated anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, Cat. No. NA931V) を用いて30分インキュベートした。検出はECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, Cat. No. RPN2132) を使用した。

#### 【0099】

その結果、SEL1L/hsHRD3、およびシノビオリンの発現抑制により両タンパク質は発現が

見られなくなった（図11）。すなわち両タンパク質は相互に安定化しあっていることが判明した。

### 【実施例6】

#### 【0100】

SEL1L/hsHRD3の安定性とシノビオリンとの複合体形成による影響

HEK293細胞にSP-HA-hsHRD3Bとベクター、またはFLAG-シノビオリンのプラスミドをトランسفエクションした。36時間後にシクロヘキシミドを加えてチエイスアッセイを開始した。0、1、2、4、6時間後に細胞を回収し、総抽出液を調整した。Western Blottingで各タンパク質を検出、定量した。

#### 【0101】

すなわち、 $2 \times 10^5$ 個のHEK293細胞を6-well plateに播いた。24時間後、以下の(g)、(h)の2種類の組み合わせのプラスミドをトランسفエクションした。

#### 【0102】

(g)  $0.5 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $0.25 \mu\text{g}$ のpcDNA3-vector

(h)  $0.5 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B / pcDNA3と $0.25 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン / pcDNA3

トランسفエクション36時間後、培地を新鮮なものに交換した。さらに2時間後、最終濃度が $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにシクロヘキシミドを添加した。0、1、2、4、6時間後に細胞を回収し、 $50 \mu\text{l}$ のExtraction Buffer III (10 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 1% NONI DET P-40, 0.1% SDS, 200 mM NaCl 10 mM N-ethylmaleimide (NEM), 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol, 0.1% aprotinin,  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin A,  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin)に溶かし氷上に30分置いた。14000rpm、30min、4°Cで遠心した後、上清 $1 \mu\text{l}$ をBio-Rad DC ProteinAssay Reagent (BIO-RAD, Cat. No. 500-0116) を用いたタンパク質濃度測定に用いた。残り $45 \mu\text{l}$ に $15 \mu\text{l}$ の $4 \times$  SDS Bufferを加え、37°Cで10分加熱した。 $10 \mu\text{g}$ 相当の細胞抽出液を7.5%アクリラミドゲルで泳動、分離し、ニトロセルロース膜 (OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC, Schleicher & Schuell, Cat. No. 10 43 9196) を用いてプロットした後、5%スキムミルクで一晩ブロッキングした。一次抗体として10000倍希釈した抗HA抗体 (3F10、Roche, Cat. No. 1 867 431) で30分インキュベートし、10000倍希釈したHRP-conjugated anti-Rat IgGで30分インキュベートした。検出はECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Cat. No. RPN2132)を用いた。検出したバンドをImageJ Softwareで定量した。正確な測定のためにChase 0時間のサンプルを2倍、4倍希釈したものを用いて標準曲線を作成し、それに基づいて両比を推定した。

#### 【0103】

その結果、SEL1L/hsHRD3 はシノビオリンの非存在下では、半減期が4.3時間から1.8時間と半分以下に短くなった（図12A、B）。すなわちSEL1L/hsHRD3はシノビオリンと複合体形成できないと、細胞内で不安定化することが判明した。

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0104】

【図1】Hrd3pとSEL1L/hsHRD3のドメイン構造を示す図である。

【図2】siRNAによるSEIL/hsHRD3の発現が抑制されたことを示す図である。

【図3】SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が抑制されたことを示す図である。

【図4】SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞のアポトーシスが誘導されたことを示す図である。

【図5】SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞へのアポトーシスが誘導されたことを示す図である。

【図6】SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞のシノビオリンタンパク質が減少したことを示す図である。

【図 7】 SEIL/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞のコラーゲン産生が抑制されたことを示す図である。

【図 8】 SEIL/hsHRD3とシノビオリンが複合体を形成したことを示す図である。

【図 9】 SEIL/hsHRD3とシノビオリンが小胞体に共局在することを示す図である。

【図 10】 SEL1L/hsHRD3の発現抑制により、滑膜細胞のインターロイキン-6の産生が抑制されたことを示す図である。

【図 11】 SEL1L/hsHRD3、およびシノビオリンの発現抑制により、両タンパク質の発現が抑制されたことを示す図である。

【図 12 A】 シノビオリンの非存在下ではSEL1L/hsHRD3は不安定であることを示す図である。

【図 12 B】 シノビオリンの非存在下ではSEL1L/hsHRD3は不安定であることを示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【0105】

配列番号4：DNA/RNA結合分子

配列番号5：DNA/RNA結合分子

配列番号6：DNA/RNA結合分子

配列番号7：DNA/RNA結合分子

配列番号8：DNA/RNA結合分子

配列番号9：DNA/RNA結合分子

配列番号10：合成DNA

配列番号11：合成DNA

配列番号12：合成DNA

配列番号13：合成DNA

配列番号14：合成DNA

配列番号15：合成DNA

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> Pharmaceutical composition comprising hsHRD3

<130> P03-0193A

<150> JP 2004-76931

<151> 2004-03-17

<160> 15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 7885

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(2427)

<400> 1

gcgaaggcga cagctctagg ggttggcacc ggcccccaga ggagg atg cgg gtc cg<sup>57</sup>  
Met Arg Val Arg

1

ata ggg ctg acg ctg ctg ctg tgt gcg gtg ctg ctg agc ttg gcc tcg  
Ile Gly Leu Thr Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Ser  
5 10 15 20

105

gcg tcc tcg gat gaa gaa ggc agc cag gat gaa tcc tta gat tcc aag  
Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser Leu Asp Ser Lys  
25 30 35

153

act act ttg aca tca gat gag tca gta aag gac cat act act gca ggc  
Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His Thr Thr Ala Gly  
40 45 50

201

aga gta gtt gct ggt caa ata ttt ctt gat tca gaa gaa tct gaa tta  
Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu Glu Ser Glu Leu  
55 60 65

249

gaa tcc tct att caa gaa gag gaa gac agc ctc aag agc caa gag ggg  
Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Asp Ser Leu Lys Ser Gln Glu Gly  
70 75 80

297

gaa agt gtc aca gaa gat atc agc ttt cta gag tct cca aat cca gaa Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asn Pro Glu 85 90 95 100	345
aac aag gac tat gaa gag cca aag aaa gta cggtt gaa cca gct ttg acc Asn Lys Asp Tyr Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys Pro Ala Leu Thr 105 110 115	393
gcc att gaa ggc aca gca cat ggg gag ccc tgc cac ttc cct ttt ctt Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His Phe Pro Phe Leu 120 125 130	441
ttc cta gat aag gag tat gat gaa tgt aca tca gat ggg agg gaa gat Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp Gly Arg Glu Asp 135 140 145	489
ggc aga ctg tgg tgt gct aca acc tat gac tac aaa gca gat gaa aag Gly Arg Leu Trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys Ala Asp Glu Lys 150 155 160	537
tgg ggc ttt tgt gaa act gaa gag gct gct aag aga cggtt cag atg Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Ala Ala Lys Arg Arg Gln Met 165 170 175 180	585
cag gaa gca gaa atg atg tat caa act gga atg aaa atc ctt aat gga Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys Ile Leu Asn Gly 185 190 195	633
agc aat aag aaa agc caa aaa aga gaa gca tat cggtt ctc caa aag Ser Asn Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg Tyr Leu Gln Lys 200 205 210	681
gca gca agc atg aac cat acc aaa gcc ctg gag aga gtg tca tat gct Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg Val Ser Tyr Ala 215 220 225	729
ctt tta ttt ggt gat tac ttg cca cag aat atc cag gca gcg aga gag Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln Ala Ala Arg Glu 230 235 240	777
atg ttt gag aag ctg act gag gaa ggc tct ccc aag gga cag act gct Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys Gly Gln Thr Ala 245 250 255 260	825
ctt ggc ttt ctg tat gcc tct gga ctt ggt gtt aat tca agt cag gca Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn Ser Ser Gln Ala 265 270 275	873
aag gct ctt gta tat tat aca ttt gga gct ctt ggg ggc aat cta ata	921

Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly Gly Asn Leu Ile			
280	285	290	
gcc cac atg gtt ttg ggt tac aga tac tgg gct ggc atc ggc gtc ctc Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly Ile Gly Val Leu			969
295	300	305	
cag agt tgt gaa tct gcc ctg act cac tat cgt ctt gtt gcc aat cat Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu Val Ala Asn His			1017
310	315	320	
gtt gct agt gat atc tcg cta aca gga ggc tca gta gta cag aga ata Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Ser Val Val Gln Arg Ile			1065
325	330	335	340
cggtg cct gat gaa gtg gaa aat cca gga atg aac agt gga atg cta Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn Ser Gly Met Leu			1113
345	350	355	
gaa gaa gat ttg att caa tat tac cag ttc cta gct gaa aaa ggt gat Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala Glu Lys Gly Asp			1161
360	365	370	
gta caa gca cag gtt ggt ctt gga caa ctg cac ctg cac gga ggg cgt Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu His Gly Gly Arg			1209
375	380	385	
gga gta gaa cag aat cat cag aga gca ttt gac tac ttc aat tta gca Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr Phe Asn Leu Ala			1257
390	395	400	
gca aat gct ggc aat tca cat gcc atg gcc ttt ttg gga aag atg tat Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu Gly Lys Met Tyr			1305
405	410	415	420
tcg gaa gga agt gac att gta cct cag agt aat gag aca gct ctc cac Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu Thr Ala Leu His			1353
425	430	435	
tac ttt aag aaa gct gct gac atg ggc aac cca gtt gga cag agt ggg Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val Gly Gln Ser Gly			1401
440	445	450	
ctt gga atg gcc tac ctc tat ggg aga gga gtt caa gtt aat tat gat Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln Val Asn Tyr Asp			1449
455	460	465	
cta gcc ctt aag tat ttc cag aaa gct gct gaa caa ggc tgg gtg gat Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln Gly Trp Val Asp			1497
470	475	480	

ggg cag cta cag ctt ggt tcc atg tac tat aat ggc att gga gtc aag Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly Ile Gly Val Lys 485 490 495 500	1545
aga gat tat aaa cag gcc ttg aag tat ttt aat tta gct tct cag gga Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu Ala Ser Gln Gly 505 510 515	1593
ggc cat atc ttg gct ttc tat aac cta gct cag atg cat gcc agt ggc Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met His Ala Ser Gly 520 525 530	1641
acc ggc gtg atg cga tca tgt cac act gca gtg gag ttg ttt aag aat Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu Leu Phe Lys Asn 535 540 545	1689
gta tgt gaa cga ggc cgt tgg tct gaa agg ctt atg act gcc tat aac Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met Thr Ala Tyr Asn 550 555 560	1737
agc tat aaa gat ggc gat tac aat gct gca gtg atc cag tac ctc ctc Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile Gln Tyr Leu Leu 565 570 575 580	1785
ctg gct gaa cag ggc tat gaa gtg gca caa agc aat gca gcc ttt att Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn Ala Ala Phe Ile 585 590 595	1833
ctt gat cag aga gaa gca agc att gta ggt gag aat gaa act tat ccc Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Pro 600 605 610	1881
aga gct ttg cta cat tgg aac agg gcc tct caa ggc tat act gtg Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln Gly Tyr Thr Val 615 620 625	1929
gct aga att aag ctc gga gac tac cat ttc tat ggg ttt ggc acc gat Ala Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly Phe Gly Thr Asp 630 635 640	1977
gta gat tat gaa act gca ttt att cat tac cgt ctg gct tct gag cag Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu Ala Ser Glu Gln 645 650 655 660	2025
caa cac agt gca caa gct atg ttt aat ctg gga tat atg cat gag aaa Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr Met His Glu Lys 665 670 675	2073
gga ctg ggc att aaa cag gat att cac ctt gcg aaa cgt ttt tat gac	2121

Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys Arg Phe Tyr Asp  
680 685 690

atg gca gct gaa gcc agc cca gat gca caa gtt cca gtc ttc cta gcc 2169  
Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro Val Phe Leu Ala  
695 700 705

ctc tgc aaa ttg ggc gtc gtc tat ttc ttg cag tac ata cgg gaa aca 2217  
Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr Ile Arg Glu Thr  
710 715 720

aac att cga gat atg ttc acc caa ctt gat atg gac cag ctt ttg gga 2265  
Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp Gln Leu Leu Gly  
725 730 735 740

cct gag tgg gac ctt tac ctc atg acc atc att gcg ctg ctg ttg gga 2313  
Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala Leu Leu Leu Gly  
745 750 755

aca gtc ata gct tac agg caa agg cag cac caa gac atg cct gca ccc 2361  
Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp Met Pro Ala Pro  
760 765 770

agg cct cca ggg cca cgg cca gct cca ccc cag cag gag ggg cca cca 2409  
Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln Glu Gly Pro Pro  
775 780 785

gag cag cag cca cca cag taataggcac tgggtccagc cttgatcagt 2457  
Glu Gln Gln Pro Pro Gln  
790

gacagcgaag gaagtttatct gctggaaaca cttgcatttg atttaggacc ttggatcagt 2517

ggtcacctcc cagaagaggc acggcacaag gaagcattga attcctaaag ctgcttagaa 2577

tctgatgcct ttatttcag ggataagtaa ctcttaccta aactgagctg aatgttttt 2637

tcagtgccat atggagtaac aactttcagt ggctttttt tttctttct ggaaacatat 2697

gtgagacact cagagtaatg tctactgtat ccagctatct ttctttggat cctttggc 2757

attatttcag tgtgcataag ttcttaatgt caaccatctt taaggtattt tgcatcgaca 2817

ctaaaaactg atcagtgtta aaaaggaaaa cccagttgca agtttaaacg tgttcgaaag 2877

tctgaaaata gaacttgctt tttaagttaa aaaaaaaaaaa aaagctatct tgaaaatgtt 2937

ttgaaactgc gataactgag aaacttctta ccagtccaca tgcaattaaa catattcagc 2997

atatttgttta tttaaaagg gagggttggg aggttctta ttggtgattt tcacacggta 3057

taccatactc	ctctcccca	aagaatgaaa	ggccttgtta	aggagtttt	tgtgagctt	3117
acttcttgg	aatggaatat	acttatgcaa	aaccttgta	actgactcct	tgcactaacg	3177
cgagtttgcc	ccacctactc	tgtaatttgc	ttgtttgttt	tgaatataac	agagccttga	3237
tccagaagcc	agaggatgga	ctaagtggga	gaaatttagaa	aacaaaacga	actctggttg	3297
gggtactacg	atcacagaca	cagacatact	tttcctaaag	ttgaaggcatt	tgttcccagg	3357
atttatttta	ctttgcattt	cttttgcac	aaagaacaca	tcaccctcct	gaattcttta	3417
aatatgaaat	atcattgcca	gggtatggct	tacagtgact	actattatca	atactaaaac	3477
tcagagaatc	aaagatggat	taaactcagt	ggttgatgaa	agccaaaacc	tgtttgtact	3537
gttctatact	attcaggtat	cttttttattt	ctgatagttt	tatattataa	tagaaagcca	3597
gccactgctt	agctatcata	gtcaccattt	tctcactgtt	aacatttagga	aaatcaaggc	3657
tactatgctt	caggattgtc	tggttaata	gtatggaaa	aaaactgaag	agtttcaaca	3717
taattacaca	cgtgaaataa	ttacagctta	aactgaattt	gtatttcatt	ttattgtcag	3777
atgggtgtgt	tcaccagcct	gtatcttgc	tgagactgca	ttcgtatctg	agcaggttt	3837
ctatgcctac	tgatgtcagt	atgtttatac	taaccttcat	gctttttcc	cagaatccct	3897
catctgccag	aaaacttgaa	aagtttattt	ctttagatgt	tgtactgctt	tgatttttga	3957
agttgggta	gtagtttagaa	ctagattaa	ctagtctata	atgaacatga	aggctttat	4017
atatgaagtt	gtataccctt	ttgtgtttag	agaattatgg	gaaaccctggt	aagcaaaaact	4077
ttcctccag	ataattgctt	ccaaattcga	agagttagtc	accaagagag	ccatatgtat	4137
gaaagcgtat	ctgtgaaagg	taggaaactt	accffffcta	agtgtaatgt	tgctttaggc	4197
aactcttgta	aatagtgaga	cttgggttgt	ctcttacatg	tagagatttgc	agtgcagtttgc	4257
gtacagtact	ttgggtgtctc	caccactgtc	ccttctcccc	gcttcaaaat	aagtgttaatc	4317
cacggtagca	gccacacttc	cttcagaagg	aactgttata	atttatttaa	aagttgaaaa	4377
accacccaag	atgactacca	actttcactt	ttttcttct	gccatccacc	ctcattttcc	4437
cttttagcaag	attttatat	ctaactttcc	ttccctccat	tgagtacgtg	ctttgagaaaa	4497
acatttctta	aaacagtgtg	tgccaccaa	ggctggatgg	gaaagtgcag	tcttgtgttt	4557

catataaaaa acacacttct tattagtta cccacttgcc tttttctatt gttaatgttc 4617  
tgaatttcct tttcttggct tgtttctact tcattttaac cctgggtcac ttgctgccag 4677  
cagtttgtga atggtgtctt tcaaataact tagttcttat ggcttcactt aaagactgtc 4737  
tcaaaaatac tttgctctct tcttctttt tgttcatggg acatggtacc taagcaaata 4797  
ggagttgggt ttgggttttc tcctaaaata atgctcaata cttacctaata caaatggcat 4857  
ccatttgaat aaaatgacaa taactaaagc tagttaatgt cagtgacatt aaactaactc 4917  
caggattcag gagtttaat gttagaattt agatttaaca gatagagtgt ggcttcattt 4977  
gtccatggta gcccatctct cctaagacct tttctagtct gtcttcctgc ctgcgaactt 5037  
gatgacagta aaaccctgtt tagtattctc ttgtgcattt ggtttgggtt ttagccgact 5097  
gtcttgaacatttattt gcttctagtt ttatttaca gaggttagcat tggtgggattt 5157  
ttttttttt ttctgtctct gtgttgaag tttcagtttc tgtttctag gtaaggctta 5217  
tttttggattt gcagtcaatg gcaaagaaaa agtaaatcaa agatgacttc tttcaaaat 5277  
gtatggccct tttattgcac ttttaactca gatgaatttta taaatttattt atcttgatac 5337  
taaggatttgcattt gcatattagg ttaattttta ctttacatgt gagagtctta 5397  
ccactaagcc attctgtctc tgtactgttgc ggaagttttg gaaaccctgc ccagtgtatc 5457  
ggtgatgatc tggatgattt tttaaagagc ctttgcatttgc tccagggaaac ttaagtattt 5517  
tattatata tatataggaa ttttttttta ttttgcatttgc tctttctctc ctttctttta 5577  
ccctcatgtt catcttcaa accagtgattt tggaagtatgt catgcaggcc tataaatgaa 5637  
aaacacaatt ctttatgtgt atagcatgtg tattatgtc taactacata cgcaaaaact 5697  
tcctttacag aggttcggac taacatttca catgcacatt tcaaaaacaag atgtgtcatg 5757  
aaaacagccc cttaacctgc caagacaagc agggctatat ttcagtgaca gctggatattt 5817  
ttgtttctga aagtgaatct cataatatat atatgttattt cacatttattt tgactagaag 5877  
tatgttaagaa atgatcagaa caaaagaaaa tttctattt catgcaataa tttttcatca 5937  
gtcatcactc tcaaatataa attaaaaat aacactcctg aatgcctgag gcacgatctg 5997  
gattttaaat gtgtggattt cattgaaaag aagctctcca cccacttggt atttcaagaa 6057

aatttaaaaac gatcccaagg aaagatgatt tgtatgttaa agtgactgca caagtaaaag 6117  
 tccaatgttgc tgcatgaa aaggattcct tggtatgtg caggaaatca tctcacatgc 6177  
 tgttttcct atttggtttg agaaacaggc tgacactatt ctcttgatt agaaaataaa 6237  
 ctcataaaaac tcataatgtt gatataatca agatgttaac cactataaat atgtagaaga 6297  
 ggaagttta aatagaccctt aagctggcat tgtgaaggaa caccatggta gactctttt 6357  
 ggtatatggta ttttgttattt aatgaaatgc agtataaagg ttggtaagt gtaataataa 6417  
 ttgtgtaaac aaatcctgtt taatagaaga gatgtacaga atcgtttgg tactgtatct 6477  
 tgaaacttgt gaaataaaga ttccactttt ggttatcctg tatgctgtaa tataccacaa 6537  
 ccaagcaccc ttccagaca gactttttt aagctgaatg aatccaattt ttatgttt 6597  
 ttggaaatt cagaagcttc tgaaaacatt cacttgcgc aatttgaatt tatcttcatt 6657  
 tttaaactcc tgaaattcag attttacaa gtccaatatt gccctaggaa gaacatgaat 6717  
 ttgctaagaa atgttatctt ttatctct gatacttttgc tcttgaagca gccttgat 6777  
 gtagtaagcg tgattcactt tagcctgatt ataatattat ttatctaaag ttgtttatg 6837  
 cattgccttgc tcccaggaat tttaagag gacttgcaga gacacgtacc acacagtaac 6897  
 atttagacta aatatgctct gagtaaagga gaaataaaaa aatattaaat caagagtgaa 6957  
 catgtacaca aagtgcattt ggaagtggc tacaattt gccccagct tcccagcagg 7017  
 caactcaaag aggttaactga ggtaaaatgt tccagctcag aagcatttgc tcttggataa 7077  
 aaaggctaca tgatgcaaac tgtggcaact gagatgtcag atctcaagat ctcaaattgt 7137  
 acttgcgggaa gcacagtcag tgacccaga tgaccttgc tgcacaaaa gttgtggggg 7197  
 aagtcggatg tcagagcctt aacaccagca ggtgaccatc caacctgggg caatgcctgc 7257  
 ctgttccacca cttagcctct ttctggcaag tcattagaat gtcctccatc ttcatggct 7317  
 gcaacttgcgat gagctacagc ctcttccta acttccttgc tgatgttagt ttaggttggt 7377  
 tataccagct tggaagtatg ctttagattaa gttacagcag atacacaaat tagatgcaag 7437  
 taaaaaaaaat cagaatttctt gtagtagaaaa ctacgaaaaa taaaaaggaa agttttact 7497  
 ttttgggtat tttttacga ataagaaaaa gtgagcgttgc atcagttcaa aaggaggtac 7557

tgctgtgtaa tgggcttgt acgttccttc tcatgtcact tacgtcacta cttcgccatc	7617
aaattgaaca agctttaat tagatcctga aaattcacta tgcttagtagt ttattggtag	7677
tattatattt tgagtagaaac tctgatttc cctagaggcc aaattcttt tatctgggtt	7737
aatttctttt aaacataaca atgttaatgc tgaattgtat attaaatccc atttctaaaa	7797
accacacaat ttttctcat gtaagttgag tggaatgtgg ttagttaact gaatttggaa	7857
tgttcatata aataatttgt tgctgctc	7885

<210> 2  
<211> 794  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2			
Met Arg Val Arg Ile Gly Leu Thr Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu			
1	5	10	15

Ser Leu Ala Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser		
20	25	30

Leu Asp Ser Lys Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His		
35	40	45

Thr Thr Ala Gly Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu		
50	55	60

Glu Ser Glu Leu Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Glu Asp Ser Leu Lys			
65	70	75	80

Ser Gln Glu Gly Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser		
85	90	95

Pro Asn Pro Glu Asn Lys Asp Tyr Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys		
100	105	110

Pro Ala Leu Thr Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His		
115	120	125

Phe Pro Phe Leu Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp  
 130 135 140

Gly Arg Glu Asp Gly Arg Leu Trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys  
 145 150 155 160

Ala Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Ala Ala Lys  
 165 170 175

Arg Arg Gln Met Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys  
 180 185 190

Ile Leu Asn Gly Ser Asn Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg  
 195 200 205

Tyr Leu Gln Lys Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg  
 210 215 220

Val Ser Tyr Ala Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln  
 225 230 235 240

Ala Ala Arg Glu Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys  
 245 250 255

Gly Gln Thr Ala Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn  
 260 265 270

Ser Ser Gln Ala Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly  
 275 280 285

Gly Asn Leu Ile Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly  
 290 295 300

Ile Gly Val Leu Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu  
 305 310 315 320

Val Ala Asn His Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Gly Ser Val  
325 330 335

Val Gln Arg Ile Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn  
340 345 350

Ser Gly Met Leu Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala  
355 360 365

Glu Lys Gly Asp Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu  
370 375 380

His Gly Gly Arg Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr  
385 390 395 400

Phe Asn Leu Ala Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu  
405 410 415

Gly Lys Met Tyr Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu  
420 425 430

Thr Ala Leu His Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val  
435 440 445

Gly Gln Ser Gly Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln  
450 455 460

Val Asn Tyr Asp Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln  
465 470 475 480

Gly Trp Val Asp Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly  
485 490 495

Ile Gly Val Lys Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu  
500 505 510

Ala Ser Gln Gly Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met  
515 520 525

His Ala Ser Gly Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu  
 530 535 540

Leu Phe Lys Asn Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met  
 545 550 555 560

Thr Ala Tyr Asn Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile  
 565 570 575

Gln Tyr Leu Leu Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn  
 580 585 590

Ala Ala Phe Ile Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn  
 595 600 605

Glu Thr Tyr Pro Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln  
 610 615 620

Gly Tyr Thr Val Ala Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly  
 625 630 635 640

Phe Gly Thr Asp Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu  
 645 650 655

Ala Ser Glu Gln Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr  
 660 665 670

Met His Glu Lys Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys  
 675 680 685

Arg Phe Tyr Asp Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro  
 690 695 700

Val Phe Leu Ala Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr  
 705 710 715 720

Ile Arg Glu Thr Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp  
725 730 735

Gln Leu Leu Gly Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala  
 740                    745                    750

Leu Leu Leu Gly Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp  
755 760 765

Met Pro Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln  
770 775 780

Glu Gly Pro Pro Glu Gln Gln Pro Pro Gln  
785 790

<210> 3  
<211> 833  
<212> PRT  
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3  
Met Ile Thr Leu Leu Leu Tyr Leu Cys Val Ile Cys Asn Ala Ile Val  
1 5 10 15

Leu Ile Arg Ala Asp Ser Ile Ala Asp Pro Trp Pro Glu Ala Arg His  
20 25 30

Leu Leu Asn Thr Ile Ala Lys Ser Arg Asp Pro Met Lys Glu Ala Ala  
35 40 45

Met Glu Pro Asn Ala Asp Glu Phe Val Gly Phe Tyr Val Pro Met Asp  
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Asn Glu Glu Lys Asn Tyr Gln Ser Ile Trp Gln Asn  
65                    70                    75                    80

Glu Ile Thr Asp Ser Gln Arg His Ile Tyr Glu Leu Leu Val Gln Ser  
85 90 95

Ser Glu Gln Phe Asn Asn Ser Glu Ala Thr Tyr Thr Leu Ser Gln Ile  
100 105 110

His Leu Trp Ser Gln Tyr Asn Phe Pro His Asn Met Thr Leu Ala His  
115 120 125

Lys Tyr Leu Glu Lys Phe Asn Asp Leu Thr His Phe Thr Asp His Ser

130

135

140

Ala Ile Phe Asp Leu Ala Val Met Tyr Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ser  
 145 150 155 160

Gly Asn Asp Gln Thr Val Ile Pro Gln Asp Ser Ala Lys Ala Leu Leu  
 165 170 175

Tyr Tyr Gln Arg Ala Ala Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ala Lys Gln Val  
 180 185 190

Leu Ala Tyr Lys Tyr Tyr Ser Gly Phe Asn Val Pro Arg Asn Phe His  
 195 200 205

Lys Ser Leu Val Leu Tyr Arg Asp Ile Ala Glu Gln Leu Arg Lys Ser  
 210 215 220

Tyr Ser Arg Asp Glu Trp Asp Ile Val Phe Pro Tyr Trp Glu Ser Tyr  
 225 230 235 240

Asn Val Arg Ile Ser Asp Phe Glu Ser Gly Leu Leu Gly Lys Gly Leu  
 245 250 255

Asn Ser Val Pro Ser Ser Thr Val Arg Lys Arg Thr Thr Arg Pro Asp  
 260 265 270

Ile Gly Ser Pro Phe Ile Ala Gln Val Asn Gly Val Gln Met Thr Leu  
 275 280 285

Gln Ile Glu Pro Met Gly Arg Phe Ala Phe Asn Gly Asn Asp Gly Asn  
 290 295 300

Ile Asn Gly Asp Glu Asp Asp Glu Asp Ala Ser Glu Arg Arg Ile Ile  
 305 310 315 320

Arg Ile Tyr Tyr Ala Ala Leu Asn Asp Tyr Lys Gly Thr Tyr Ser Gln  
 325 330 335

Ser Arg Asn Cys Glu Arg Ala Lys Asn Leu Leu Glu Leu Thr Tyr Lys  
 340 345 350

- Glu Phe Gln Pro His Val Asp Asn Leu Asp Pro Leu Gln Val Phe Tyr  
 355 360 365

Tyr Val Arg Cys Leu Gln Leu Leu Gly His Met Tyr Phe Thr Gly Glu  
 370 375 380

Gly Ser Ser Lys Pro Asn Ile His Met Ala Glu Glu Ile Leu Thr Thr  
 385 390 395 400

Ser Leu Glu Ile Ser Arg Arg Ala Gln Gly Pro Ile Gly Arg Ala Cys  
405 410 415

Ile Asp Leu Gly Leu Ile Asn Gln Tyr Ile Thr Asn Asn Ile Ser Gln  
420 425 430

Ala Ile Ser Tyr Tyr Met Lys Ala Met Lys Thr Gln Ala Asn Asn Gly  
435 440 445

Ile Val Glu Phe Gln Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ser Phe Pro Glu Glu  
450 455 460

Lys Ile Gly Asp Pro Phe Asn Leu Met Glu Thr Ala Tyr Leu Asn Gly  
465 470 475 480

Phe Ile Pro Ala Ile Tyr Glu Phe Ala Val Met Ile Glu Ser Gly Met  
485 490 495

Asn Ser Lys Ser Ser Val Glu Asn Thr Ala Tyr Leu Phe Lys Thr Phe  
500 505 510

Val Asp Lys Asn Glu Ala Ile Met Ala Pro Lys Leu Arg Thr Ala Phe  
515 520 525

Ala Ala Leu Ile Asn Asp Arg Ser Glu Val Ala Leu Trp Ala Tyr Ser  
530 535 540

Gln Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Thr Ala Gln Val Ser Ala Ala Tyr  
545 550 555 560

Leu Met Tyr Gln Leu Pro Tyr Glu Phe Glu Asp Pro Pro Arg Thr Thr  
565 570 575

Asp Gln Arg Lys Thr Leu Ala Ile Ser Tyr Thr Arg Ala Phe Lys  
580 585 590

Gln Gly Asn Ile Asp Ala Gly Val Val Ala Gly Asp Ile Tyr Phe Gln  
595 600 605

Met Gln Asn Tyr Ser Lys Ala Met Ala Leu Tyr Gln Gly Ala Ala Leu  
610 615 620

Lys Tyr Ser Ile Gln Ala Ile Trp Asn Leu Gly Tyr Met His Glu His  
625 630 635 640

Gly Leu Gly Val Asn Arg Asp Phe His Leu Ala Lys Arg Tyr Tyr Asp  
645 650 655

Gln Val Ser Glu His Asp His Arg Phe Tyr Leu Ala Ser Lys Leu Ser  
660 665 670

Val Leu Lys Leu His Leu Lys Ser Trp Leu Thr Trp Ile Thr Arg Glu  
675 680 685

Lys Val Asn Tyr Trp Lys Pro Ser Ser Pro Leu Asn Pro Asn Glu Asp  
690 695 700

Thr Gln His Ser Lys Thr Ser Trp Tyr Lys Gln Leu Thr Lys Ile Leu  
705 710 715 720

Gln Arg Met Arg His Lys Glu Asp Ser Asp Lys Ala Ala Glu Asp Ser  
725 730 735

His Lys His Arg Thr Val Val Gln Asn Gly Ala Asn His Arg Gly Asp  
740 745 750

Asp Gln Glu Glu Ala Ser Glu Ile Leu Gly Phe Gln Met Glu Asp Leu  
755 760 765

Val Thr Met Gly Cys Ile Leu Gly Ile Phe Leu Leu Ser Ile Leu Met  
770 775 780

Ser Thr Leu Ala Ala Arg Arg Gly Trp Asn Val Arg Phe Asn Gly Ala  
785 790 795 800

Gln Leu Asn Ala Asn Gly Asn Arg Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln  
805 810 815

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Gly Trp Asp Phe Asn Val Gln Ile Phe Ala  
820 825 830

Ile

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 4

cuugauaagg accagcuuut t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

出証特2005-3036701

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; DNA/RNA binding molecule

&lt;400&gt; 5

aaagcugguc cauaaucaagt t

21

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; DNA/RNA binding molecule

&lt;400&gt; 6

ggcuacgucc aggagcgcat t

21

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; DNA/RNA binding molecule

&lt;400&gt; 7

ugcgcuccug gacguagcct t

21

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; DNA/RNA binding molecule

&lt;400&gt; 8

gguguucuuu gggcaacuga gtt-----

23

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

出証特2005-3036701

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 9  
cucaguugcc caaagaacac ctt

23

<210> 10  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 10  
ggctgaacag ggctatg 17

<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 11  
ccgctcgagt tacttgttg gctgctgctc 30

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 12  
agctgggttt tggctttag 20

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 13  
gggtggcccc tgatccgcag

20

<210> 14  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 14  
aggtaaggt cggagtcaac gga

23

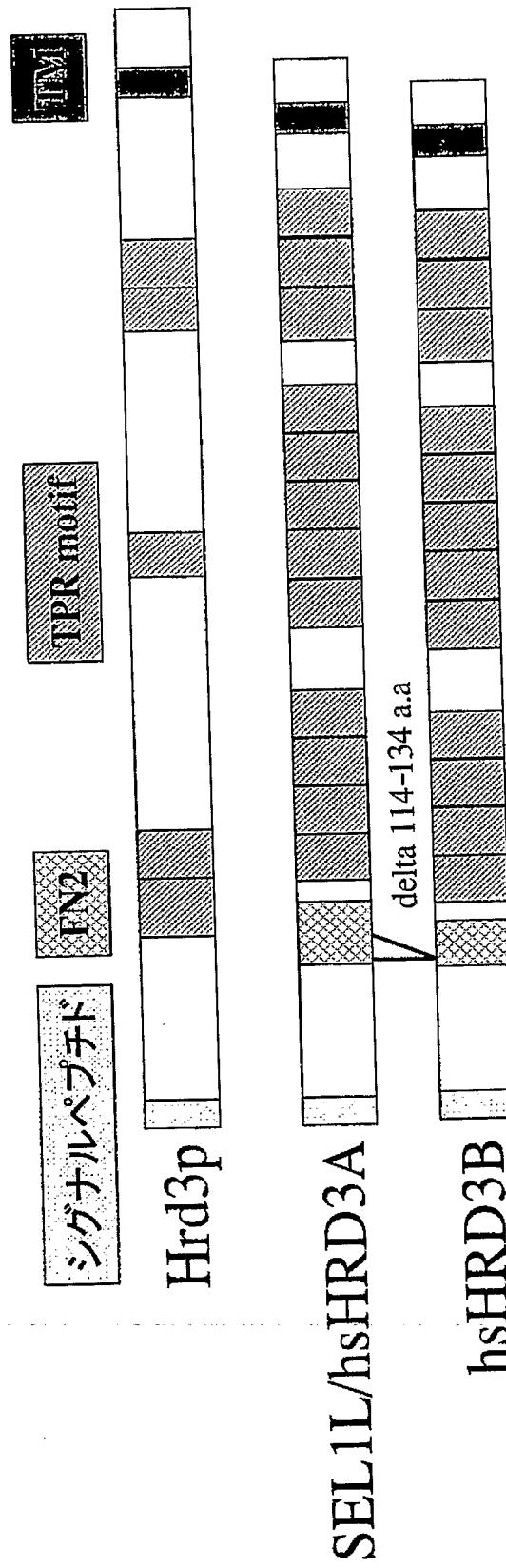
<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

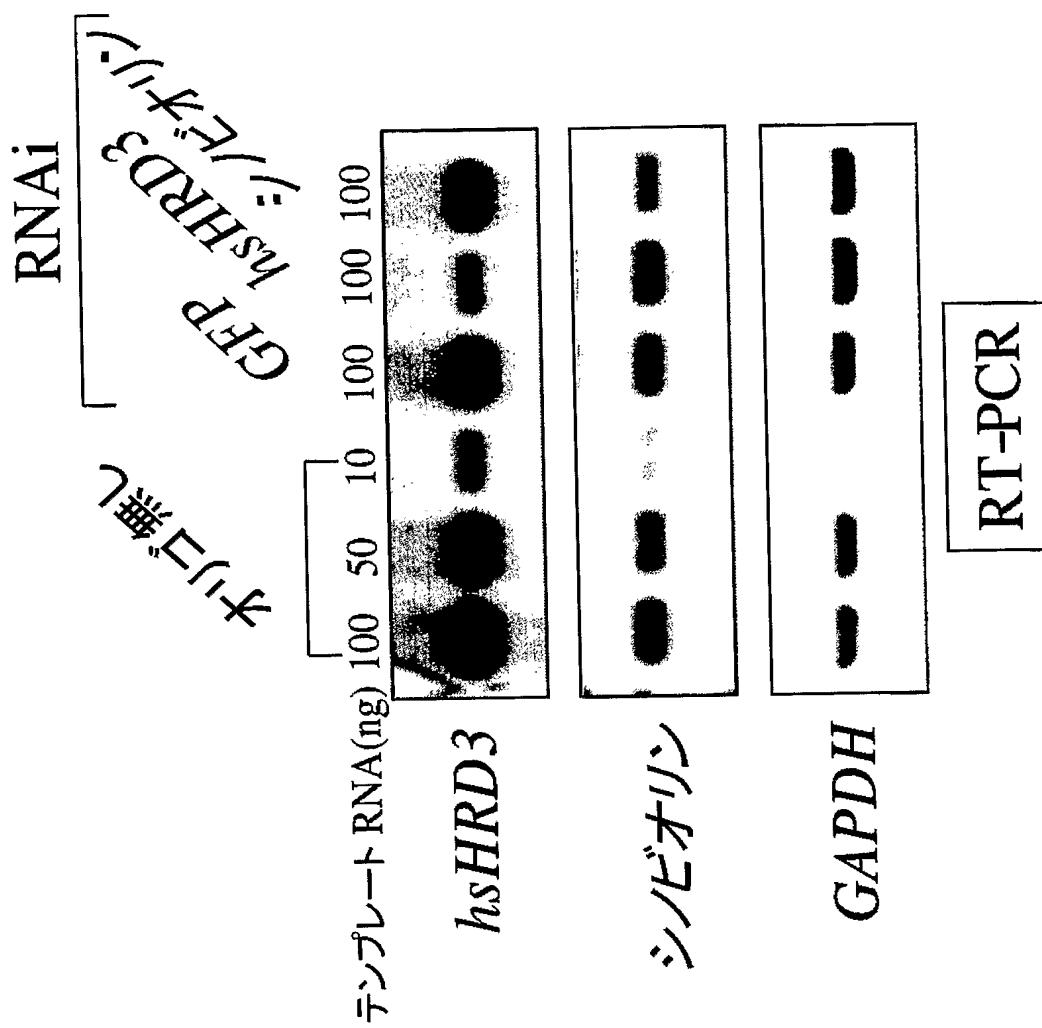
<400> 15  
agtccttcca cgataccaaa gttg

24

【書類名】 図面  
【図 1】

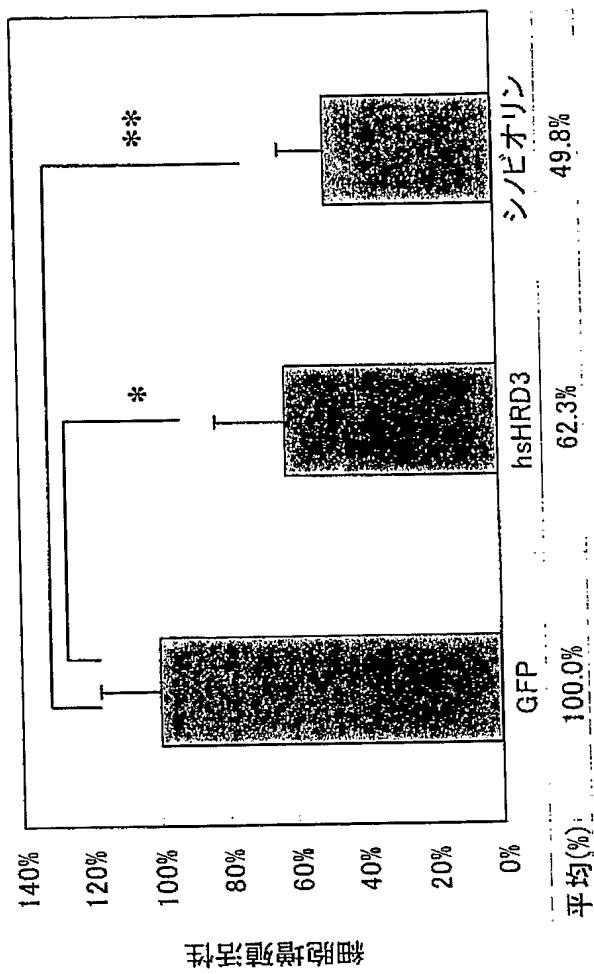


【図 2】



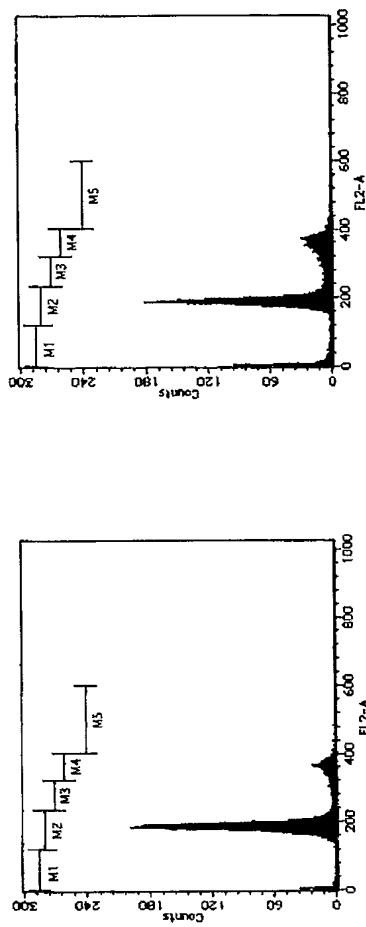
【図3】

## 細胞増殖活性



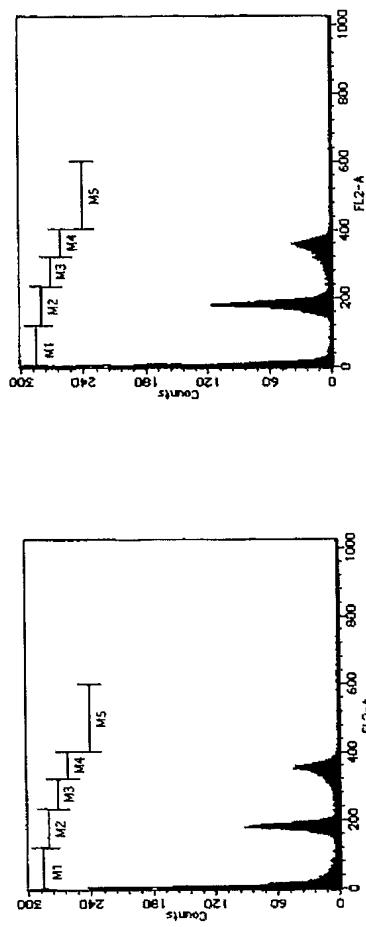
【図4】

RNAi - GFP

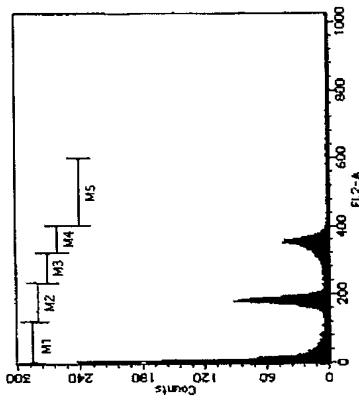


オリゴ無し

RNAi - シノビオジン

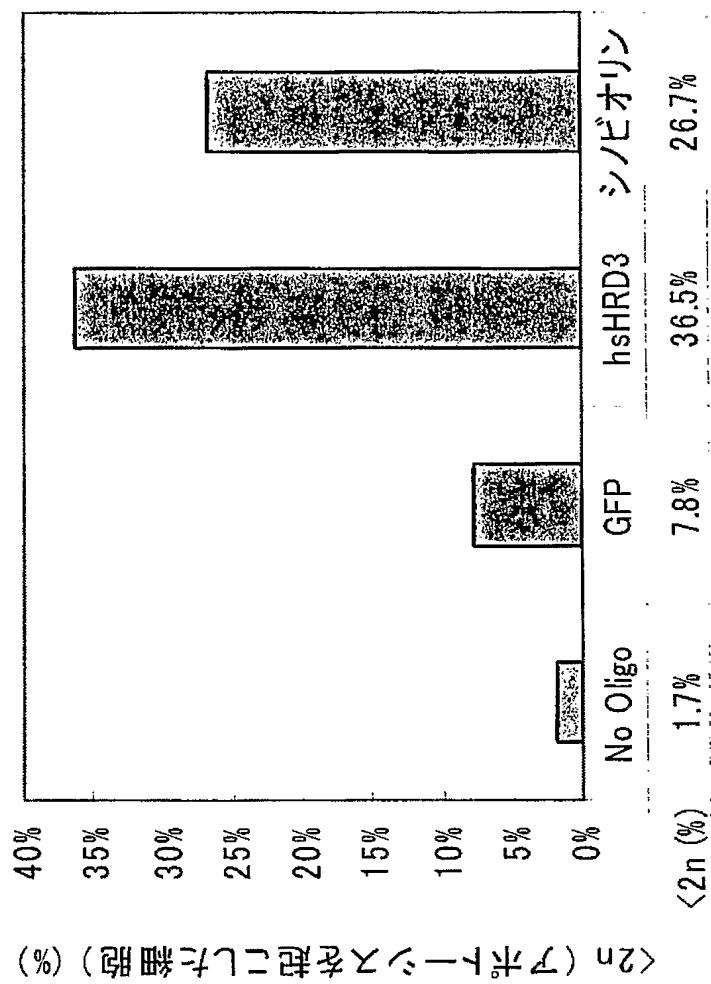


RNAi - hsHRD3

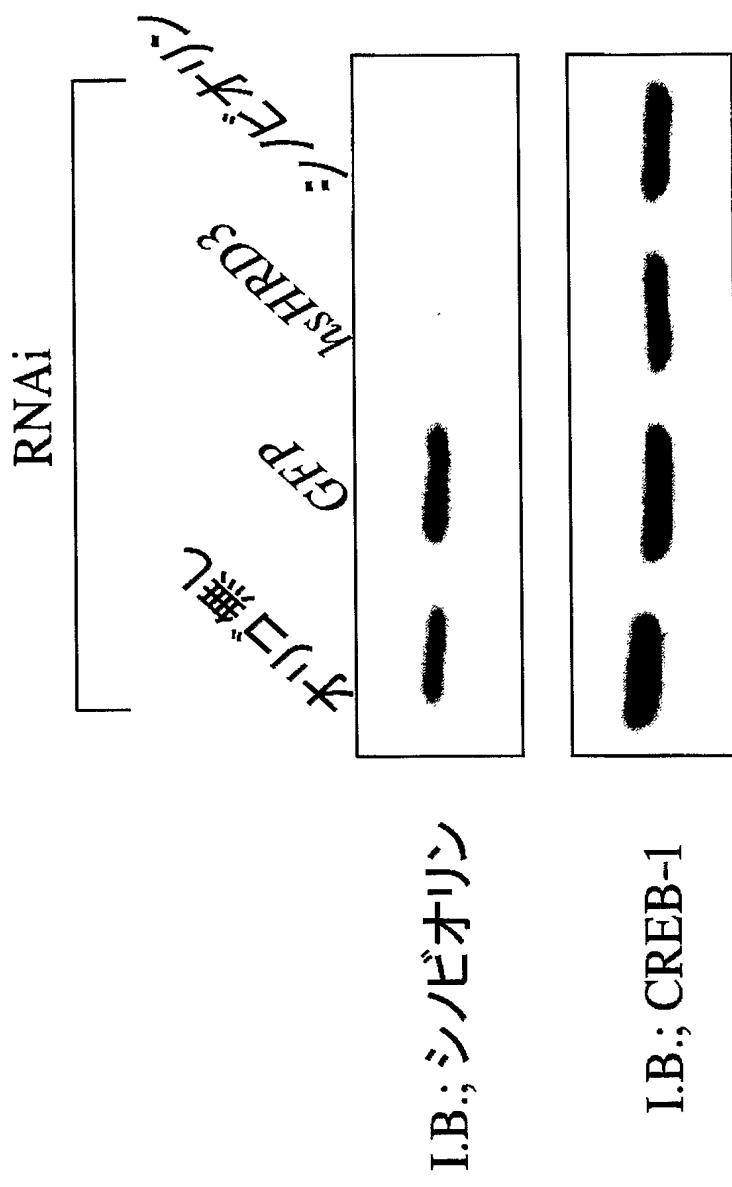


【図 5】

## RNAiによるアボトーシス

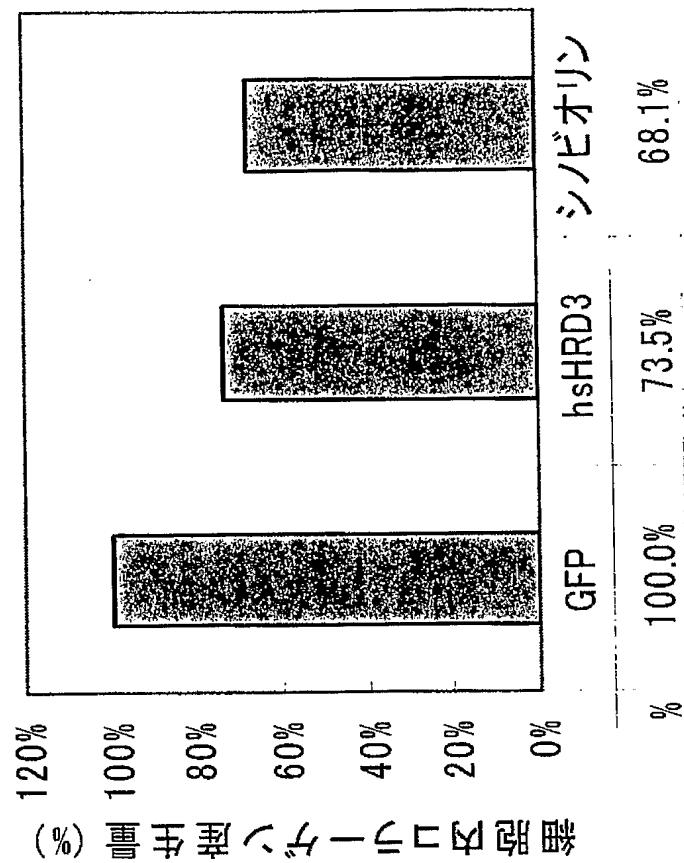


【図 6】

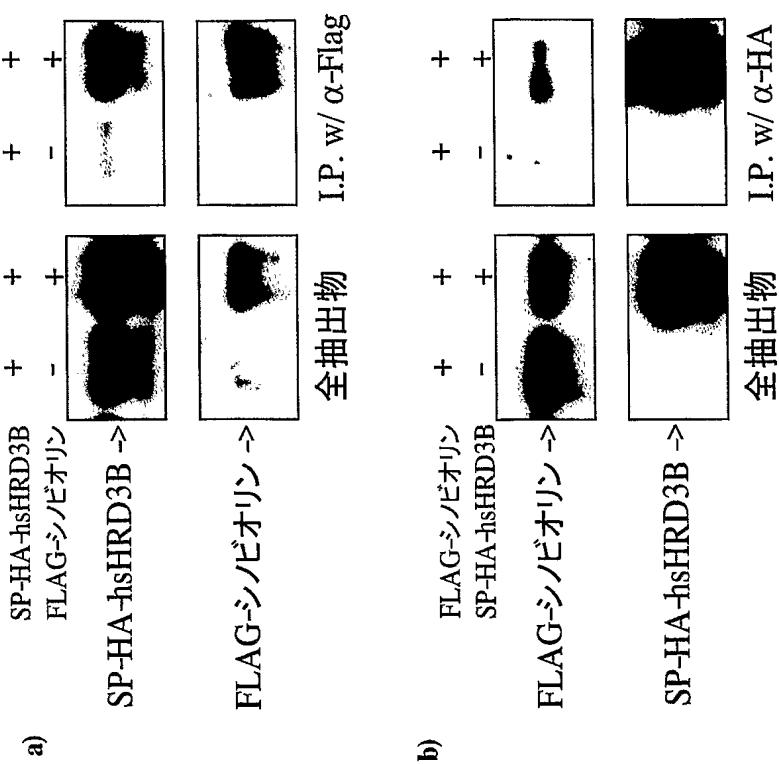


【図 7】

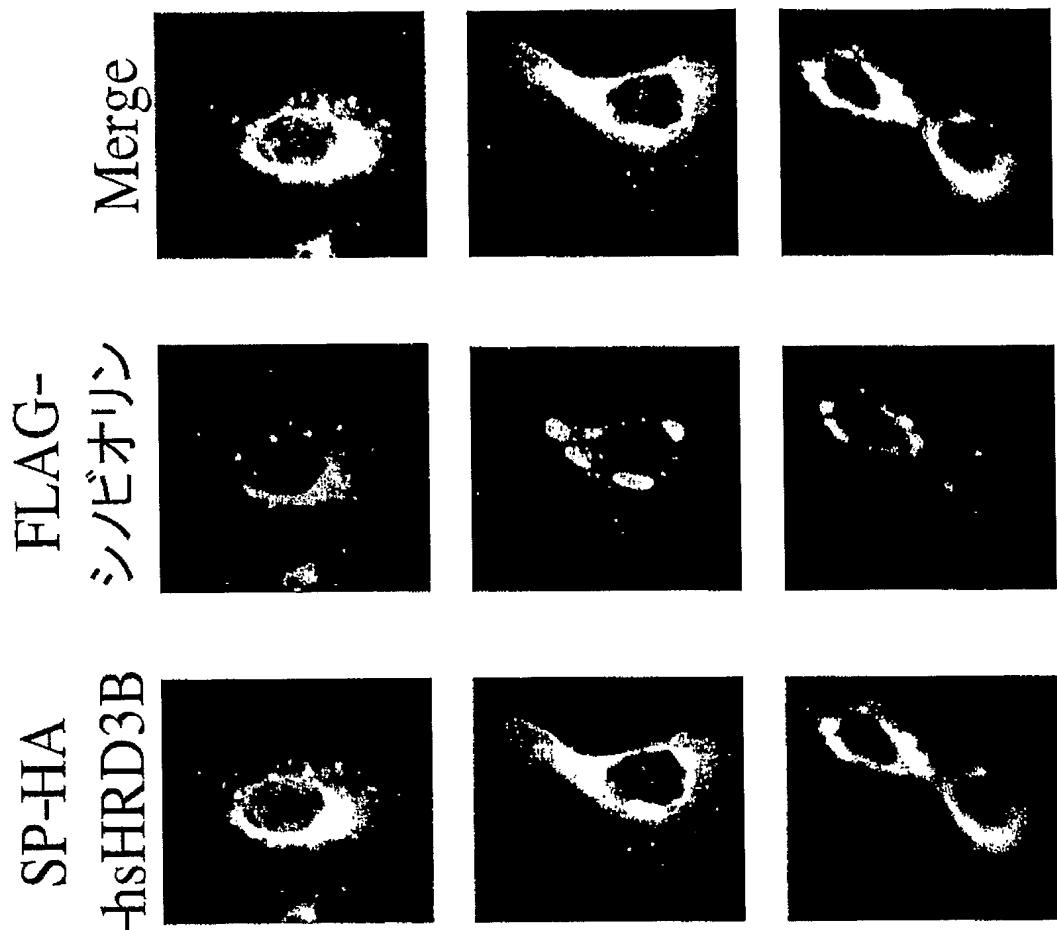
## 細胞内コラーゲン産生量



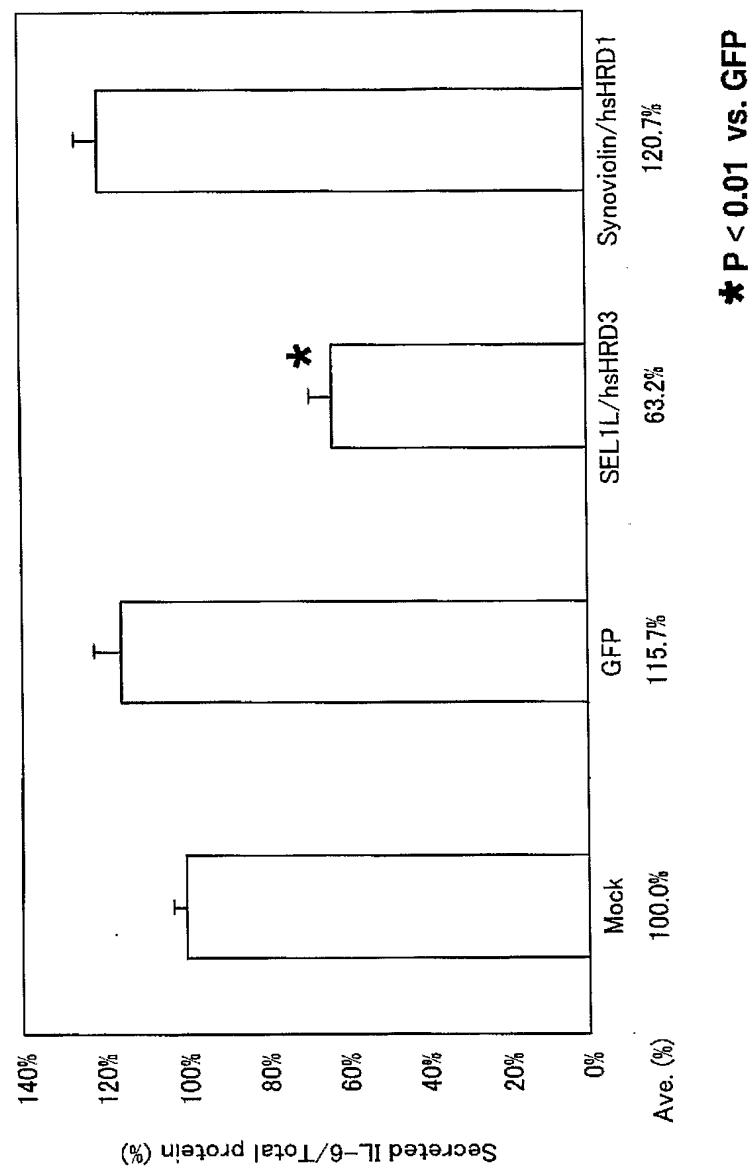
【図8】



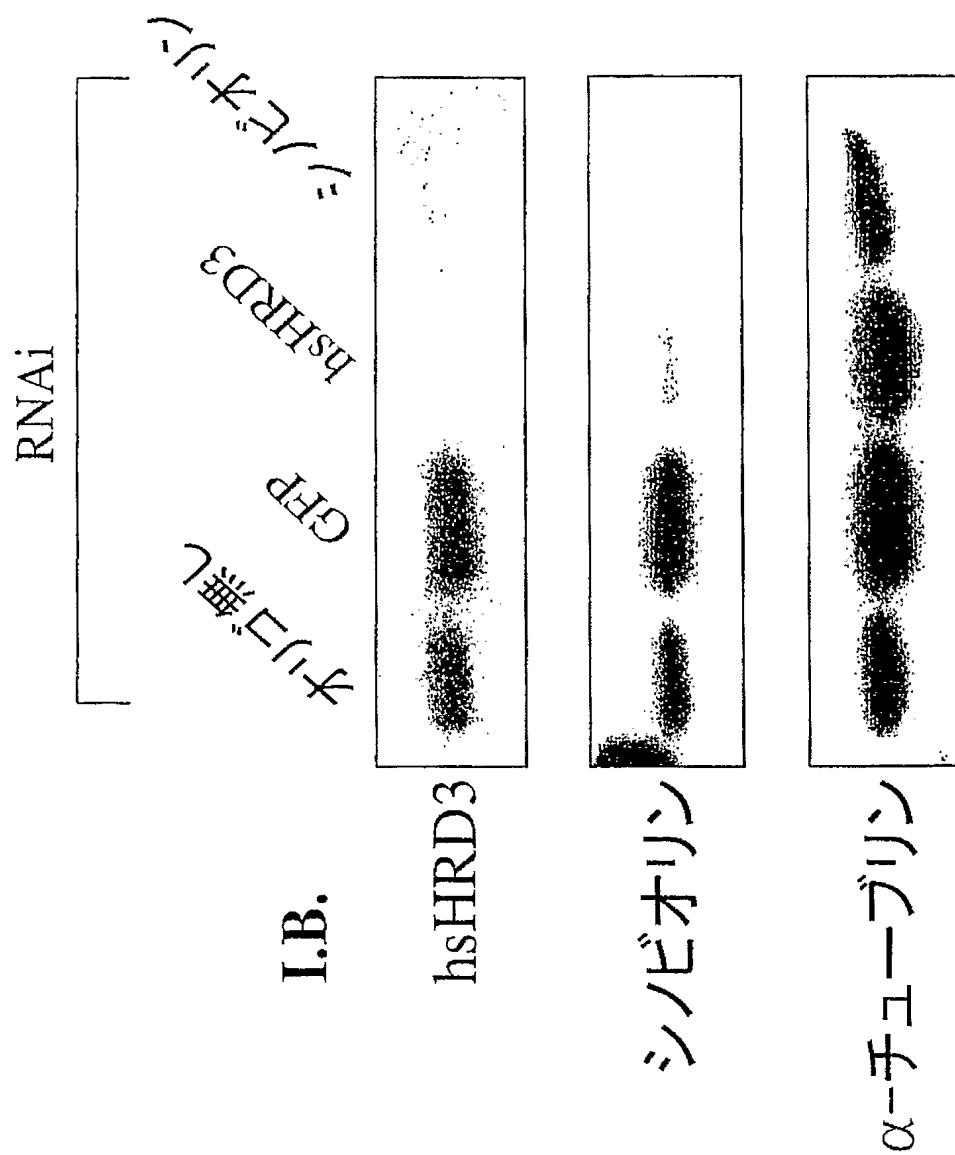
【図9】



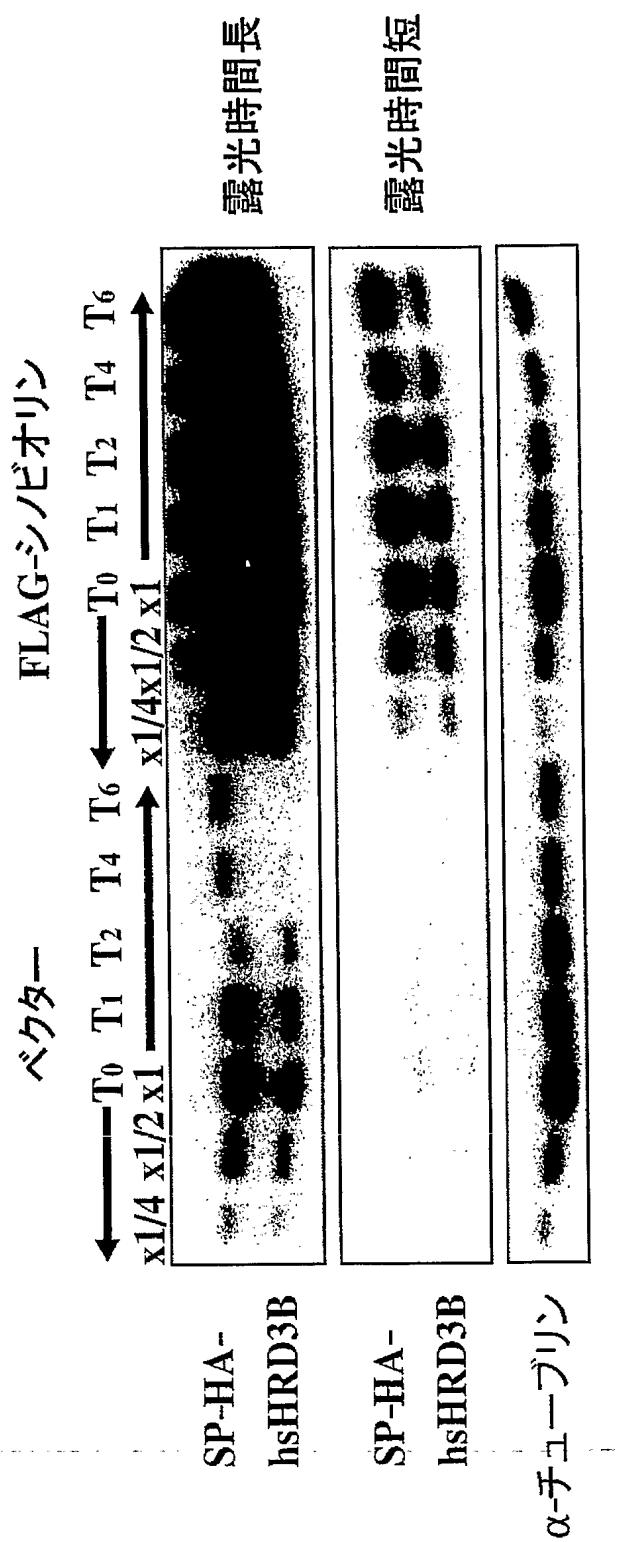
【図10】



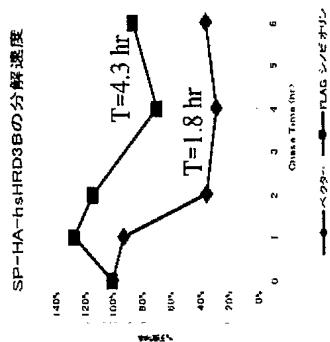
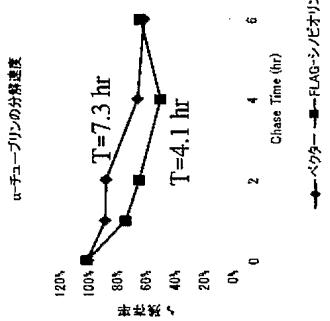
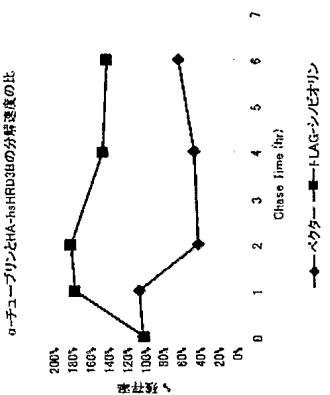
【図 11】



【図 12 A】



【図 12B】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 滑膜組織又は滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物の提供。

【解決手段】 リウマチ、線維症、関節炎、癌及び/又は脳神経疾患を診断又は治療するために有用な、滑膜組織又は滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する医薬組成物、並びに滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する方法。

【選択図】なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-314364
受付番号	50401846818
書類名	特許願
担当官	中村 佳代 7842
作成日	平成 16 年 11 月 4 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 301050902

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門 4 丁目 1 番地 1 号 虎ノ門パス  
トランク本館 7 階

【氏名又は名称】 株式会社ロコモーション

## 【代理人】

【識別番号】 100092783

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9  
階 阿部・井窪・片山法律事務所

【氏名又は名称】 小林 浩

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100095360

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲 2-8-7 福岡ビル 9 階  
阿部・井窪・片山法律事務所

【氏名又は名称】 片山 英二

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100093676

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲 2-8-7 福岡ビル 9 階  
阿部・井窪・片山法律事務所

【氏名又は名称】 小林 純子

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100120134

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9  
階 阿部・井窪・片山法律事務所

【氏名又は名称】 大森 規雄

特願 2004-314364

出願人履歴情報

識別番号 [503302207]

1. 変更年月日 2004年 8月 6日

[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消

[統合先識別番号] 301050902

住所 東京都港区虎ノ門4-1-1 虎ノ門パストラル本館7階  
氏名 株式会社ロコモジエン

特願 2004-314364

## 出願人履歴情報

識別番号 [301050902]

1. 変更年月日 2004年 8月 6日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館  
7階  
氏 名 株式会社ロコモジエン

2. 変更年月日 2004年 8月 6日  
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合  
[統合元識別番号] 503302207  
住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館  
7階  
氏 名 株式会社ロコモジエン